

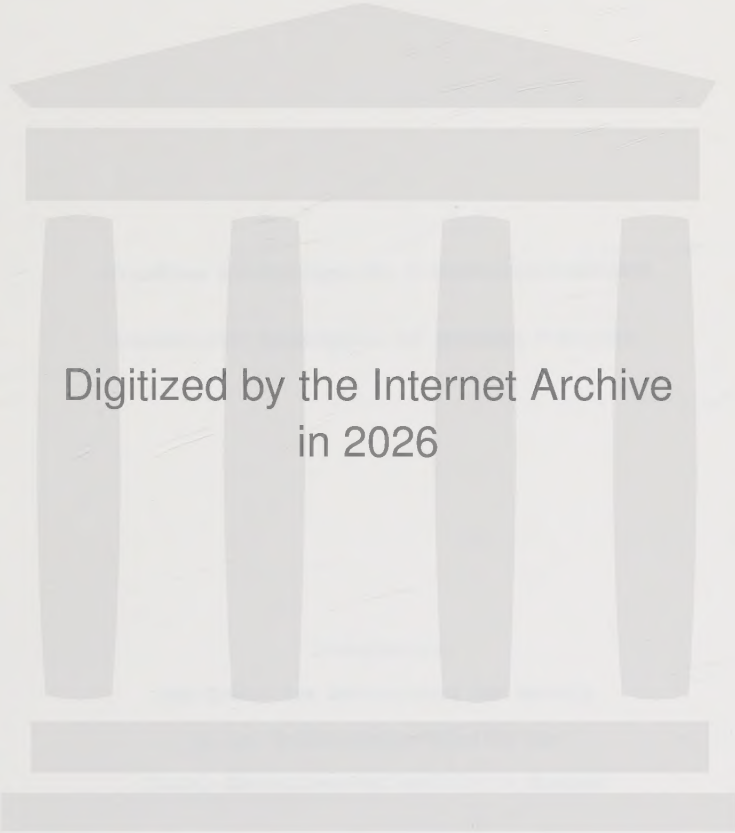
**Circadiane Schwankungen
der β -Adrenozeptorendichte
menschlicher Lymphozyten
bei gesunden Probanden**

Andreas Markus Pangerl

Disbui. München

1987





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554619_0069

Aus dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Professor Dr. W. Forth

Circadiane Schwankungen der β -Adrenozeptorendichte

menschlicher Lymphozyten bei gesunden Probanden

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Andreas Markus Pangerl

aus Hannover

1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. J. Remien

Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Forth

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. E. Haen

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.1987

Meinen Eltern gewidmet

Danksagung

Sehr herzlich danke ich:

Herrn Prof. Dr. Jörg Remien, Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie / München, für die Ueberlassung des Themas und seine Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Ekkehard Haen, Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie / München, für seine Beratung bei Durchführung und Auswertung der Versuche.

Christina Lemmermann und Iris Reithmaier, Walther-Straub-Institut für Pharmakologie, und Sybille Kirzinger, Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität in der Pettenkoferstraße / München, für ihre Hilfe bei der praktischen Ausführung der Versuche. Jeder Versuchstag bedeutete 36 Stunden Arbeit rund um die Uhr, die in Schichten aufgeteilt oft ungewöhnliche Arbeitszeiten mit sich brachte.

Herrn Dr.J. Schopol, Medizinische Universitätsklinik der Ludwig-Maximilians-Universität in der Ziemsenstraße/München, für die Bestimmung der Plasmakonzentrationen des Cortisol

Herrn Professor Dr. Franz Halberg, Chronobiology Laboratories/University of Minnesota in Minneapolis/USA, für die Ueberlassung der automatischen Blutdruckgeräte

Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

- 1) HAEN E; REMIEN J; PANGERL A; SCHOPOL J (1986) :

Chronobiologic Studies of β -Adrenoceptors on Peripheral Lymphocytes
Abstract from the 18. Congres annuel du Groupe d'Etude des Rythmes
Biologiques, Paris / France, January 30 - 31, p 4

- 2) PANGERL A; REMIEN J; HAEN E (1986) :

Circadian Variation in the Number of β -Adrenoceptor Sites on Intact Human Lymphocytes
Abstract from the Second International Montreux Conference of Chrono-
pharmacology, Montreux / Switzerland, March 10 - 13, p V-7

- 3) PANGERL A; REMIEN J; HAEN E (1986) :

The Number of β -Adrenoceptorsites on Intact Human Lymphocytes Depends on Time of Day, on Season, and on Sex
in: Annual Review of Chronopharmacology Vol 3 (eds A Reinberg,
M Smolensky, G Labreque), Pergamon Press Oxford / New York, 331-334

- 4) LANGENMAYER I; PANGERL A; EISELANDER H (1987) :

The Circadian Variation of β -Adrenoceptor Density in Asthma
Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharm Vol. 335, Suppl R 76: A 302 (abstract)

Inhaltsverzeichnis

Seite:

1. EINLEITUNG.....	1
2. METHODIK.....	4
2.1. Material	
2.1.1. Substanzen und Lösungen.....	4
2.1.2. Geräte.....	5
2.2. Versuchspersonen und Ablauf des Versuchstages.....	6
2.3. Methoden	
2.3.1. Blutentnahme.....	7
2.3.2. Lymphozytenpräparation.....	8
2.3.3. Rezeptorbindungsversuche.....	9
2.3.4. Bestimmung der Cortisolkonzentration im Plasma.....	14
2.3.5. Bestimmung der Leukozyten-, der Lymphozyten-, und der Granulozytenzahl.....	14
2.3.6. Bestimmung des Blutdrucks und des Puls.....	15
2.3.7. Statistische Auswertung	
2.3.7.1. Circadiane Unterschiede.....	15
2.3.7.2. Saisonale Unterschiede.....	17
2.3.7.3. Interindividuelle Standardisierung.....	18
2.3.7.4. Korrelationen.....	18
3. ERGEBNISSE.....	19
3.1. Schwankungen der β -Adrenozeptorendichte (B-max) an intakten Lymphozyten (individuelle Daten)	
3.1.1. B-max (Bindungsstellen/Zelle).....	19
3.1.2. Saisonale Unterschiede der β -Adrenozeptorendichte.....	21
3.2. Tagesschwankungen der untersuchten physiologischen Variablen der Männer)	
3.2.1. Expression der β -Adrenozeptoren an intakte Lymphozyten	
3.2.1.1. β -Adrenozeptorendichte.....	22
3.2.1.2. Dissoziationskonstante K_d für (-)-125 J-CYP.....	24
3.2.2. Cortisol Plasmakonzentration.....	25
3.2.3. Lymphozyten-, Leukozyten-, und Granulozytenzahl	
3.2.3.1. Lymphozyten.....	26
3.2.3.2. Leukozyten.....	27
3.2.3.3. Neutrophile Granulozyten.....	28
3.2.4. Blutdruck und Puls	
3.2.4.1. Systolischer Blutdruck.....	29



3.2.4.2. Diastolischer Blutdruck.....	30
3.2.4.3. Arterieller Mitteldruck.....	31
3.2.4.4. Puls.....	32
3.2.5. Korrelationen zwischen den physiologischen Variablen.....	33
3.3. <u>Tagesschwankungen der untersuchten physiologischen Variablen der Frauen</u>	
3.3.1. Expression der β -Adrenozeptoren an intakten Lymphozyten	
3.3.1.1. β -Adrenozeptorendichte.....	34
3.3.1.2. Dissoziationskonstante K_d für (-) 125 J-CYP.....	34
3.3.2. Cortisol Plasmakonzentration.....	36
3.3.3. Lymphozyten-, Leukozyten-, und Granulozytenzahl	
3.3.3.1. Lymphozyten.....	37
3.3.3.2. Leukozyten.....	38
3.3.3.3. Neutrophile Granulozyten.....	39
3.3.4. Blutdruck und Puls	
3.3.4.1. Systolischer Blutdruck.....	40
3.3.4.2. Diastolischer Blutdruck.....	41
3.3.4.3. Arterieller Mitteldruck.....	42
3.3.4.4. Puls.....	43
3.3.5. Korrelationen zwischen den physiologischen Variablen.....	43
4. DISKUSSION.....	44
4.1. <u>Circadiane Veränderungen der untersuchten Variablen</u>	
4.1.1. Circadiane Schwankungen des Blutdrucks, des Puls, der Cortisolkonzentration und der Zahl der weißen Blutzellen.....	44
4.1.2. Circadiane Schwankungen an β_2 -Adrenozeptoren intakter Lymphozyten.....	45
4.2. <u>β_2-Adrenozeptoren an Lymphozyten als Indikator für die periphere sympathische Aktivität bei der Kreislaufregulation</u>	51
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	55
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	57
7. ANHANG.....	63

1. EINLEITUNG

Periphere Lymphozyten sind ein verbreitetes Untersuchungsmaterial für β -Adrenozeptorstudien, da Lymphozyten durch eine einfache, den Probanden kaum belastende Blutentnahme gewonnen werden können. An Lymphozyten sind β_2 -Adrenozeptoren nachgewiesen (6,25,62).

Bisher konnte eine circadiane Schwankung der β -Adrenozeptordichte, nicht signifikant über 24 Stunden dargestellt werden (22,38,41,57), trotz einiger Hinweise, daß die Dichte tagsüber höher ist als nachts (22,38).

Die β -Adrenozeptordichte wird durch Katecholamine erniedrigt (21,34) und durch Glukokortikoide erhöht (11,52). Die Plasmaspiegel von Noradrenalin und Adrenalin zeigen circadiane Schwankungen, mit Maxima zwischen 14h00 und 16h00 und Minima zwischen 02h00 und 04h00 (3,19,48). Auch die Plasmakonzentration von Cortisol zeigt tagesrhythmische Schwankungen, mit einem Maximum um 08h00 und einem Minimum um 24h00 (3,19,26,51,61). Da diese die β -Adrenozeptordichte beeinflussenden Parameter circadian schwanken, ist auch eine Tagesrhythmik der β -Adrenozeptordichte wahrscheinlich und soll in dieser Arbeit mit einem Radio-Rezeptor-Assay (Ligand $-^{125}\text{I}$ -Jodocyanopindolol) untersucht werden.

Wiederholt wurde eine positive Korrelation zwischen Blutdruck und der Dichte von β_2 -Adrenozeptoren an Lymphozyten gefunden

(9,10,12,13,20,39,44,45,46,49). Dies führte zu der Hypothese, daß β_2 -Adrenozeptoren an Lymphozyten als Modell für präsynaptische β_2 -Adrenozeptoren im sympathischen System der Blutdruckregulation gelten können (44,56). Eine Stimulation der prä-synaptischen β_2 -Adrenozeptoren eine vermehrte Freisetzung von Noradrenalin an peripheren Nervenendigungen. Noradrenalin stimuliert α -Adrenozeptoren an glatten Muskelzellen von Blutgefäßen, die Gefäßmuskulatur kontrahiert sich und der periphere Widerstand steigt. Zusätzlich stimuliert Noradrenalin β_1 -Adrenozeptoren im Herz, dies steigert die Pumpfunktion des Herzens (46,56). Vereinfachend läßt sich also sagen, daß eine Stimulation der prä-synaptischen β_2 -Adrenozeptoren den Blutdruck erhöhen kann.

Für die Blutdruckregulation wichtige β_2 -Adrenozeptoren befinden sich auch postsynaptisch, an der glatten Muskulatur der Gefäßwände. Ihre Stimulation senkt den Blutdruck durch eine Gefäßdilatation (46,56). Dieser blutdrucksenkende Effekt steht im Widerspruch zur positiven Korrelation zwischen Blutdruck und der Dichte von β_2 -Adrenozeptoren an Lymphozyten (9,10,12,13,20,39,44,45,46,49). Es stellt sich die Frage, warum die β_2 -Adrenozeptoren an Lymphozyten nur die präsynaptischen, nicht aber die postsynaptischen β_2 -Adrenozeptoren widerspiegeln sollen.

Bereits seit dem Ende des 19. Jahrhunderts (31,33,63) wurde von circadianen Schwankungen des Blutdrucks berichtet. Der Blutdruck zeigt hohe Werte tagsüber und während der Nacht ein deutliches Tief (17,28,29,31,33,43,47,54,60,63). Der Puls verhält sich entsprechend (43,47,63).

Sollten Veränderungen an β_2 -Adrenozeptoren eine Rolle in der Blutdruckregulation spielen, so ist bei ihnen eine, mit dem circadianen Verlauf des Blutdrucks korrelierende, circadiane Veränderung zu erwarten.

Ein circadianer, also ein um die Dimension der Zeit erweiterter Ansatz, geht über bisherige, die β_2 -Adrenozeptordichte an Lymphozyten mit dem Blutdruck vergleichende Arbeiten (9,10,12,13,18,20,36,39,44,45,46,49) hinaus, da tagesrhythmischen Veränderungen beider Parameter die Zusammenhänge innerhalb des komplexen Regelsystems im funktionellen Ablauf zeigen können. Daher wurde parallel zur Bestimmung der circadianen Variation der β_2 -Adrenozeptordichte der Blutdruck gemessen.

2. METHODIK

2.1. MATERIAL

2.1.1. Substanzen und Lösungen

EDTA : Äthylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz
Hersteller Fa. Merck Darmstadt

Hämacolor Schnellfärbung: Hersteller Fa. E. Merck, Darmstadt

Hanks-Hepes Puffer (HH-Puffer):

Zusammensetzung: Inhaltsstoffe für 1 l destilliertes Wasser

Kalziumchlorid	185.5 mg	(1.26 mmol/l)
Kaliumchlorid	400.0 mg	(5.4 mmol/l)
Kaliumhydrogenphosphat	60.0 mg	(0.44 mmol/l)
Magnesiumsulfat	200.0 mg	(0.80 mmol/l)
Natriumchlorid	8000.0 mg	(136.9 mmol/l)
Natriumhydrogenphosphat	60.0 mg	(0.42 mmol/l)
Natriumhydrogencarbonat	350.0 mg	(4.3 mmol/l)
Hepes	5800.0 mg	(25 mmol/l)

mit Natriumhydroxyd auf pH = 7.4 eingestellt,

Indikator Phenolrot 10 mg/l

Chemikalien hergestellt von Fa. Merck, Darmstadt

Es wurde Aqua Tridest. (Millipor) verwendet

Hepes: Hersteller: Sigma Chemical Company, St. Louis,
USA

Zusammensetzung:

N-2-Hydroxyäthylpiperazin-N'-2-äthansulfonsäure

pKa = 7.5 (25°C)

(-) 125-Jodocyanopindolol (125-J-CYP):

Hersteller Amersham Buchter B5
spezifische Aktivität 2100 Ci/mmol
1 mCi/ml, 37 MBq/ml
Konzentration: 476 pmol/l

Lympho-paque :

Hersteller: Nyegard & Co., Oslo, Norwegen
Zusammensetzung: Sodium Metrizoat und Dextran
- Dichte 1.086 g/ml

RIA Kit der Firma DRG Instruments, 3550 Marburg 1,
Schwanallee 44

(-)Timolol : Hersteller: MSD, München

2.1.2. Geräte

Blutdruckmessgerät: stationäres Sphygmomanometer mit Printer
Typ BP - 203 YM II

Hersteller Fa. Nippon Colin, Komatsu, Japan
Dieses Gerät arbeitet nach der Oszillations Methode.
Anschluß: 220V Netzteil
Erwachsenenmanschette

Coulter Counter, Channalyzer, xy-Drucker:

Firma Coulter Electronics Ltd., Harpenden
Herts, England

Gamma Counter: Auto Gamma Scintillation Spectrometer 5260,
Hersteller: Packard

Oelimmersionsmikroskop: Hersteller Fa. Zeiss Optik

Zentrifugen:

- Swing-out Zentrifuge der Firma Christ

Schleuderradius 11.5cm

- Festwinkelrotor Zentrifuge der Firma Christ, Laborfuge II

Typ I zur Serumgewinnung mit Drehzahleinstellung,

Schleuderadius 10cm

Typ II zum Abzentrifugieren des Radioaktiven

überstandes. Ohne Drehzahlregulierung (18000g)

2.2. VERSUCHSPERSONEN UND ABLAUF DES VERSUCHSTAGES

11 Freiwillige, 7 Männer und 4 Frauen blieben über 25 Stunden von jeweils 17h30 bis 18h30 des folgenden Tages im Institut. In Tabelle 1 sind Geschlecht, Alter, das Datum des Versuchstages und die Schlafzeiten aufgeführt.

Tabelle 1: Liste der Versuchspersonen

Die Versuchspersonen sind durchnummeriert nach dem Datum des Versuchstages. Angegeben ist die Nummer des Probanden, sein Geschlecht und Alter, das Datum des Versuchstages und seine Schlafzeiten.

Nummer	Geschlecht	Alter	Datum des Versuchs	Schlafzeit
1	männlich	34	22./23. 4.	05h00-10h00
2	männlich	32	6./ 7. 5.	01h00-07h00
3	männlich	24	20./21. 5.	23h45-07h30
4	weiblich	22	2./ 3. 6.	23h00-06h00
5	weiblich	28	24./25. 5.	00h15-08h30
6	weiblich	23	15./16. 6.	01h30-08h30
7	männlich	32	2./ 3.12.	00h00-07h00
8	männlich	25	5./ 6.12.	00h00-09h15
9	weiblich	29	9./10.12.	23h00-08h00
10	männlich	32	12./13.12.	23h45-08h00
11	männlich	23	16./17.12.	01h30-09h45

Für die Nacht stand ein Apartment im Institut zur Verfügung. Schlafzeiten, Mahlzeiten und Beschäftigung während des Versuchstages waren den Versuchspersonen freigestellt. Der normale Lebensrhythmus sollte beibehalten werden, wobei keine der Personen sich körperlich anstrengen durfte.

Alle Versuchspersonen waren gesund und hatten in der Woche vor dem Versuchstag einen regelmäßigen Lebensstil gehabt.

Keine der Versuchspersonen nahm Medikamente, mit Ausnahme der weiblichen Versuchspersonen 4 und 5, die orale Kontrazeptiva benutzten. Die weiblichen Versuchspersonen befanden sich an unterschiedlichen Tagen ihres Menstruationszyklus (Versuchsperson 4: 10.Tag, 5: 6.Tag, 6: 3.Tag, 9: 2.Tag)

2.3. METHODEN

2.3.1. Blutentnahme

Alle 4 Stunden um 18h00, 22h00, 02h00, 06h00, 10h00, 14h00, 18h00, wurden 25 ml Blut aus einer Kubitalvene abgenommen, mit 250 mg EDTA versetzt (10 mg EDTA / ml Blut) und sofort weiter verarbeitet:

1. Aus dem EDTA-Blut wurden zwei Stichproben zur Bestimmung der Leukozytenzahl entnommen (Kapitel 2.3.5.)
2. Aus dem EDTA-Blut wurden zwei Blutaustriebe auf Objektträger aus Glas erstellt (Kapitel 2.3.5.)
3. Von der Hälfte des EDTA-Blutes wurde durch Zentrifugation (Kapitel 2.3.4.). Die am Boden des Zentrifugengefäßes verblieben Blutzellen wurden wieder dem Restblut beigemischt und mit zur Lymphozytenpräparation verwendet (Kapitel 2.3.2.)

Bei Versuchsperson 1 und 2 begannen die Messungen erst um 22h00.

2.3.2. Lymphozytenpräparation

Die Abtrennung der Lymphozyten erfolgte nach der Methode von Böyum (4) mit Lympho-paque.

Zur Abtrennung der Lymphozyten wurde das EDTA-Blut mit Hanks-Hepes-Puffer (= HH-Puffer, pH=7.4) im Verhältnis 1:1 verdünnt. In 2 verschließbare 24ml-Zentrifugengefäße wurde danach das verdünnte Blut im Verhältnis 2 Volumenteile Blut auf 1 Volumenteil Lympho-paque so aufgeschichtet, daß es keine Vermischung gab.

Nach 30 Minuten Zentrifugation bei 800g (2500 U/min, Schleuderradius 11.5 cm) in einer Swing-Out Zentrifuge zeigte sich ein weißlicher Lymphozytenring auf dem oberen Miniskus der Lympho-paque Schicht.

Das Plasma-Puffergemisch über dem Lymphozytenring wurde mit einer Wasserstrahlpumpe bis knapp über den Lymphozytenring abgesaugt und dieser mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgenommen. Die so gewonnene Zellsuspension wurde in zwei 12ml-Zentrifugengefäßen mit HH-Puffer auf je ca. 10 ml verdünnt und gut mit der Pasteurpipette aufgewirbelt. Die Zellen wurden dann in einer Swing-out Zentrifuge für 10 Minuten bei 800g (2500 U/min) abzentrifugiert. Nach Abgießen der Ueberstände wurden die Zellen erneut in jeweils 5ml HH-Puffer aufgewirbelt, in ein einzelnes 12ml-Zentrifugengefäß abgefüllt und anschließend für 10 Minuten bei 600g (2000 U/min) in der Swing-out Zentrifuge abzentrifugiert. Nach Abgießen des Ueberstandes wurden die Zellen erneut in 5ml HH-Puffer aufgewirbelt.

In einem Coulter Counter wurde die Zellzahl aus zwei 20 µl Stichproben der Lymphozytensuspension je 3 mal gemessen und ein Mittelwert für die Zellkonzentration der Suspension errechnet. Anschließend wurde die Lymphozytensuspension auf ca. 5×10^6 Zellen/ml mit HH-Puffer verdünnt.

Durch Auftragen der Häufigkeitsverteilung der in der Suspension vorkommenden Zellgrößen wurde die Güte der Zelltrennung kontrolliert

2.3.3. Rezeptorbindungsversuche:

Zur Bestimmung der β -Adrenozeptorendichte an intakten Lymphozyten und der Affinität des Rezeptors wurde ein Radio-Rezeptor-Assay mit ^{125}J odocyanopindolol (^{125}J -CYP) als Radioligand verwendet (6,44,45,46,50).

Am Nachmittag vor dem 24 Stundenversuch wurde für jede der 7 Uhrzeiten, an denen eine Blutentnahme stattfinden sollte, ein Versuchsaufbau nach Tabelle 2 (ohne Zugabe der $100\ \mu\text{l}$ Zellsuspension) in verschließbaren Reaktionsgefäßen (Cups) angesetzt und getrennt nach Uhrzeiten in einem Kühlraum bei 5°C gelagert.

Angesetzt wurden Proben ohne (-) Timolol zur Bestimmung der Gesamtbindung (Bindung des radioaktiv markierten Liganden ^{125}J -CYP spezifisch an Rezeptormoleküle und unspezifisch an andere Strukturen) und mit (-)Timolol zur Bestimmung der unspezifische Bindung bei Verdrängung ^{125}J -CYPs von der Rezeptorbindungsstelle durch den nicht radioaktiv markierten Liganden (-)Timolol. (siehe Tabelle 2)

Zu jedem Blutentnahmezeitpunkt wurden, nach Durchführung der Zelltrennung (Kapitel 2.3.2.) je $100\ \mu\text{l}$ der Zellsuspension in die für diese Uhrzeit vorbereiteten Reaktionsgefäße (Cups) pipettiert.

Ausgehend von einer Zellkonzentration von ca. 5×10^6 Zellen/ml der Zellsuspension (Kapitel 2.3.2.) ergab sich durch die Verdünnung von 1:10 eine Zellzahl von ca. 5×10^5 Zellen/Reaktionsgefäß.

Nach der Zugabe der Zellen wurden die Reaktionsgefäße verschlossen. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden in einem Wasserbad bei 37°C wurden die Proben mit $18000g$ für 5 Minuten in einer Festwinkelrotorzentrifuge zentrifugiert. Der Ueberstand wurde danach vorsichtig mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt, ohne die Zell-Pellets zu beschädigen.

Tabelle 2: Pipettierschema des Radio-Rezeptor-Assays für einen Zeitpunkt

Für jeden Zeitpunkt (18h00, 22h00, 02h00, 06h00, 10h00, 14h00, und 18h00) wurde nach folgendem Pipettierschema vorgegangen:

Angaben in μl

Cup Nummer	1	2	3	4	5	6
Puffer :	895	875	892.5	872.5	890	870
Verdränger :	-	20	-	20	-	20
Ligand :	5	5	7.5	7.5	10	10
Zellen :	100	100	100	100	100	100
	7	8	9	10	11	12
Puffer :	885	865	880	860	870	850
Verdränger :	-	20	-	20	-	20
Ligand :	15	15	20	20	30	30
Zellen :	100	100	100	100	100	100
	13	14	15	16	17	18
Puffer :	855	835	840	820	810	790
Verdränger :	-	20	-	20	-	20
Ligand :	45	45	60	60	90	90
Zellen :	100	100	100	100	100	100
	19	20				
Puffer :	780	760				
Verdränger :	-	20				
Ligand :	120	120				
Zellen :	100	100				

Probenvolumen : 1000 μl pro Cup

Puffer : Hanks-Hepes Puffer , pH = 7.4

Verdränger : (-) Timolol, Konzentration : 5000 pmol/l

→ Konzentration im Ansatz: 100 pmol/l

Ligand : (-) 125 Jodocyanopindolol

Konzentration vom Hersteller: 476 pmol/l

vor dem Pipettieren :

1:1000 mit Hanks-Hepes Puffer verdünnt auf 0.476 pmol/l

→ Konzentration im Ansatz zwischen 2.3 pmol/l (5 μl) und 57.1 pmol/l (120 μl)

Zellen : ca. 0.5 10^6 Zellen / Ansatz

Die im Reaktionsgefäß verbliebene Radioaktivität wurde dann in einem γ -Counter gemessen (Meßzeit pro Probe 1 Minute).

Um die ursprünglich in die Reaktionsgefäße pipettierte Radioaktivität (100% Wert) bestimmen zu können, wurden zusätzlich für jede Konzentration des Liganden vier Messungen ohne Absaugen des Ueberstandes durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt.

Errechnung der Adrenozeptorendichte und Dissoziationskonstante anhand von Beispielen (vgl. Abbildung 1 und 2)

Abbildung 1 zeigt die Sättigungskinetik der Bindung von 125 -J-CYP an lymphozytäre β -Rezeptoren.

Die freie Konzentration von 125 Jodocyanopindolol (125 J-CYP) errechnet sich aus der Differenz der gemessenen Radioaktivität des 100% Wertes und der Gesamtbindung. In dem hier gewählten Beispiel schwankt die errechnete Konzentration von 125 J-CYP zwischen 1.8 pmol/l (für 5 μ l 125 J-CYP im Ansatz) und 32 pmol/l (für 120 μ l 125 J-CYP im Ansatz)

Die spezifische Bindung [Moleküle 125 J-CYP/Zelle] ergibt sich aus der Differenz der Gesamtbindung und der unspezifischen Bindung, und drückt die an β -Adrenozeptoren gebundene Menge 125 J-CYP aus.

Die unspezifische Bindung steigt bei steigenden freien Konzentrationen des Liganden J-CYP linear an, während die spezifische Bindung im untersuchten Konzentrationsbereich annähernd sättigbar ist.

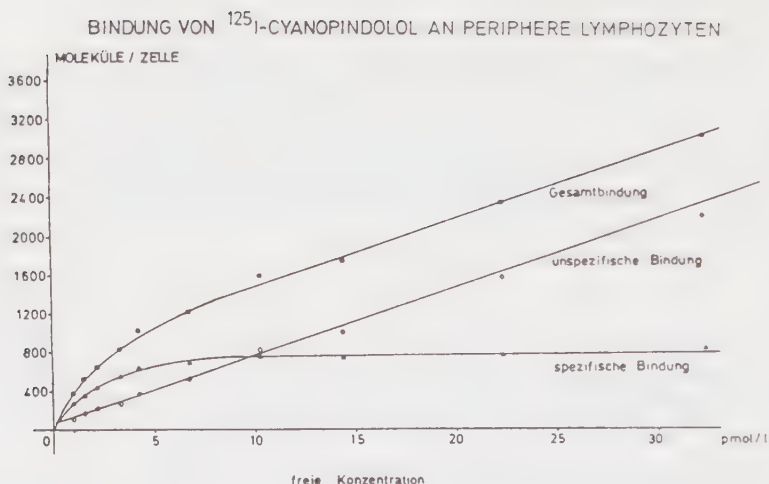


Abb. 1: Bindung von ^{125}J odocyanopindolol an periphere Lymphozyten

Sättigungskinetik von ^{125}J -CYP bei steigender freier Konzentration des Radioliganden. Auf der x-Achse ist die freie Konzentration des Liganden in pmol/l, auf der y-Achse die Anzahl gebundener Moleküle pro Zelle aufgetragen. Die Gesamtbindung ist mit $\blacksquare$ — $\blacksquare$, die unspezifische Bindung mit $\diamond$ — $\diamond$ und die spezifische Bindung mit $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ gekennzeichnet.

Die Rezeptorendichte (B_{max}) und die Affinität des Rezeptors für ^{125}J -CYP (Dissoziationskonstante K_d) wurden nach der Methode von Scatchard (53) bestimmt.

Die Auftragung der 10 Meßpaare B/F (Spezifische Bindung / freie Konzentration) gegen B (spezifische Bindung) zeigt keine lineare Beziehung (Abbildung 2). Daher wurde bei der Abschätzung der Bindungsparameter von einer sättigbaren, hochaffinen Bindungsstelle und einer Konstante für einen nicht sättigbaren Bindungsanteil für ^{125}J -CYP ausgegangen.

Mit Hilfe eines nicht-linearen Kurvenanpassungsprogramms (Gauss-Newtonsches Iterationsverfahren nach Hartley) wurde an die experimentell gewonnenen Bindungsdaten eine

Scatchardfunktion angepasst. Der Schnittpunkt der Asymptote mit der Abszisse ergibt die Rezeptorendichte B_{max} . Die Dissoziationskonstante K_d ist der negative Kehrwert der Steigung der Asymptote. Eine niedrige K_d bedeutet eine hohe Affinität des Rezeptors für 125-J-CYP.

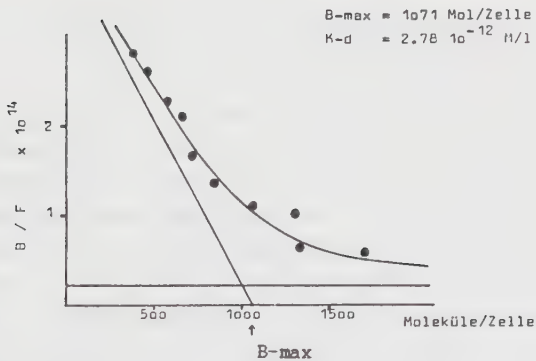


Abb. 2: Beispiel eines Scatchardplots

Hier ist eine Scatchardfunktion an die Bindungsdaten angepasst. Auf der x-Achse ist die Zahl der spezifisch an β -Adrenozeptoren gebundenen Moleküle pro Zelle (spezifische Bindung B), auf der y-Achse das Verhältnis zwischen spezifischer Bindung und freier Konzentration (B/F) aufgetragen. Jeder Punkt entspricht einer der 10 Konzentrationen des Liganden. Der Schnittpunkt der Asymptote an den steilen Teil der Bindungskurve mit der Abszisse entspricht der geschätzten β -Adrenozeptorendichte (B_{max}).

2.3.4. Bestimmung der Cortisol Konzentration im Plasma :

Von der Hälfte des gewonnenen Blutes wurde in einer Laborfuge II mit Festwinkelrotor, 10 Minuten bei 900g (2500 U/min, Schleuderradius 10cm), Plasma abzentrifugiert und mit einer Pasteurpipette abgenommen. Das so gewonnene Plasma wurde sofort bei -20°C tiefgefroren. Die Bestimmung der Cortisolkonzentration im Plasma wurde später mit einem Radio-Immuno-Assay (RIA) von Herrn Dr. J. Schopoll in der Medizinischen Universitäts-Klinik München durchgeführt.

2.3.5. Bestimmung der Leukozyten-, der Lymphozyten-, und der Granulozytenzahl :

Zum Messen der Leukozytenzahl wurden zwei Stichproben von je 40µl dem vorher mit einer Pasteurpipette aufgewirbelten EDTA Blut entnommen und je 3 x die Leukozytenzahl mit einem Coulter Counter gemessen. Hieraus wurde ein Mittelwert für die Leukozytenkonzentration im Blut der Versuchsperson errechnet.

Aus einem Differentialblutbild wurde die prozentuale Aufteilung der Leukozyten in Lymphozyten, neutrophile Granulozyten und andere Zelltypen festgestellt. Die absoluten Werte für Lymphozyten und Granulozyten konnten mit Hilfe der Gesamtleukozytenzahl hieraus errechnet werden.

2.3.6. Bestimmung des Blutdrucks und des Puls:

Der systolische, der diastolische, und der mittlere Blutdruck, sowie der Puls wurden durch ein automatisches, stationäres Blutdruckmessgerät mit Drucker und Timer, nach der Oszillationsmethode gemessen.

Zu jeder vollen Stunde wurde 5 mal mit einem Abstand von einer Minute vollautomatisch gemessen und die Werte aufgezeichnet. Die Blutdruckmanschette wurde an dem Oberarm getragen, an dem keine Blutentnahmen stattfanden. Die Manschette wurde direkt auf der Haut getragen.

Zu den Blutentnahmeterminen um 18h00, 22h00, 02h00, 06h00, 10h00, 14h00, und 18h00, fand die Blutdruckmessung 5 Minuten vor der Blutentnahme statt.

Die Versuchspersonen hatten spätestens 10 Minuten vor der Blutdruckmessung bei dem Gerät zu sein, sollten aber am besten ständig die Blutdruckmanschette tragen.

Nachts wurde die Blutdruckmanschette ständig getragen. Hier wurde zu jeder vollen Stunde nur einmal gemessen, um den Schlaf der Versuchspersonen möglichst wenig zu stören.

Zur chronobiologischen Auswertung der Kreislaufdaten ist der Mittelwert der 2. - 4. Messung zu jeder Stunde errechnet und weiter verwendet worden. Bei den Nachtwerten handelt es sich nur um eine Messung.

2.3.7. Statistische Auswertung :

2.3.7.1. Circadiane Unterschiede

Ein Meßgröße zeigt eine "circadiane Schwankung" ("circadiane Variation"), wenn sie über den Tag (circa-dian

[=lateinisch]: "ungefähr ein Tag") unterschiedlich hohe Werte erreicht. Bei einem "circadianen Rhythmus" muß zusätzlich gesichert sein, daß die circadiane Schwankung wiederholt nachweisbar ist. Um deutlich zu machen, daß die Wiederholbarkeit in der vorliegenden Arbeit zwar in der Gruppe, am Individuum aber nur durch eine zweimalige Messung der 18h00 Werte nachgeprüft wurde, wird anstatt von "circadianen Rhythmen" nur von "circadianen Schwankungen" oder von "circadianen Variationen" gesprochen. Als "circadiane Schwankungsbreite" wird die Differenz zwischen dem höchsten und dem niedrigsten Wert über 24 Stunden bezeichnet.

Die circadianen Schwankungen wurden bei einzelnen Individuen mit der Cosinor Analyse (single cosinor (26)), bei Gruppen von Individuen mit dem Populationscosinor (population mean cosinor (27)) und der Varianz Analyse (anova= analysis of variance) bewertet.

Mit der Varianzanalyse (anova) wird geprüft, ob von den 7 beziehungsweise 6 Werten innerhalb der 24 Stunden Meßdauer, mindestens zwei signifikant unterschiedlich sind. Als Signifikanzgrenze wird $p < 0.05$ gewählt.

Für die Varianzanalyse wurden die Meßwerte in % des 24-Stundenmittelwertes ausgedrückt. Der "24h-Mittelwert" ($24h-\bar{x}$) ist das arithmetische Mittel aller Messungen einer Versuchsperson. Er wurde als 100% gesetzt und die Einzelwerte in % dieses Wertes angegeben.

Cosinor Analyse und Populationscosinor passen den Daten über eine vorzugebende Periode (hier 24 Stunden) eine Cosinusfunktion an und ermöglichen die Abschätzung der folgenden Parameter:

- a. Der **Mesor**: (midline estimating statistic of rhythm)
Er ist der Mittelwert der den Daten angepassten Cosinuskurve. Der Mesor weicht vom einfachen arithmetischen Mittel über 24h ab, wenn nicht über ganze 24h gemessen wird oder die Meßpunkte nicht gleichmäßig über den Tag verteilt liegen (nicht äquidistant) sind.
- b. Die **circadiane Amplitude**: Die "circadiane Amplitude" bezeichnet die maximale Abweichung der Cosinuskurve von ihrer Mittellage. Die "doppelte Amplitude" ist das gesamte Ausmaß der voraussagbaren Schwankung.
- c. Die **circadiane Akrophase** : Sie gibt den Abstand zwischen einem Referenzzeitpunkt (hier Mitternacht 00h00) und dem Zeitpunkt an, an dem die angepasste Cosinuskurve ihr Maximum erreicht.
Die Akrophase wird als Ortszeit in Stunden und Minuten oder in Grad angegeben (24h00/00h00 oder 360°/0°)
- d. Der **p-Wert**: Er gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit die Nullhypothese (Amplitude = 0) nicht verworfen werden kann. Als Signifikanzgrenze wird $p < 0.05$ gewählt.
- e. Der **PR-Wert**: Er bezeichnet den Anteil der Variation der Einzelmessungen, der durch die angepaßte Cosinusfunktion erklärt werden kann. Dieser Wert stellt ein objektives Kriterium für die "Güte" der Anpassung dar.

2.3.7.2. Saisonale Unterschiede

Zur Bewertung saisonaler Unterschiede wurde der Student t-Test verwendet.

2.3.7.3. Interindividuelle Standardisierung

Um interindividuell tageszeitliche Schwankungen besser vergleichen zu können, sind bei einigen Abbildungen und für die Varianzanalyse die absoluten Werte in % des 24 Stunden Mittelwertes ausgedrückt. Dies ist im Text jeweils besonders erwähnt.

2.3.7.4. Korrelationen

Korrelationen zwischen 24 Stunden-Mittelwerten, circadianen Amplituden, und circadianen Variationen wurden mit der linearen Regression untersucht.

3. ERGEBNISSE

3.1. Schwankungen der β -Adrenozeptorendichte an intakten Lymphozyten (B-max) (individuelle Daten)

3.1.1. B-max (Bindungsstellen/Zelle):

männliche Versuchspersonen:

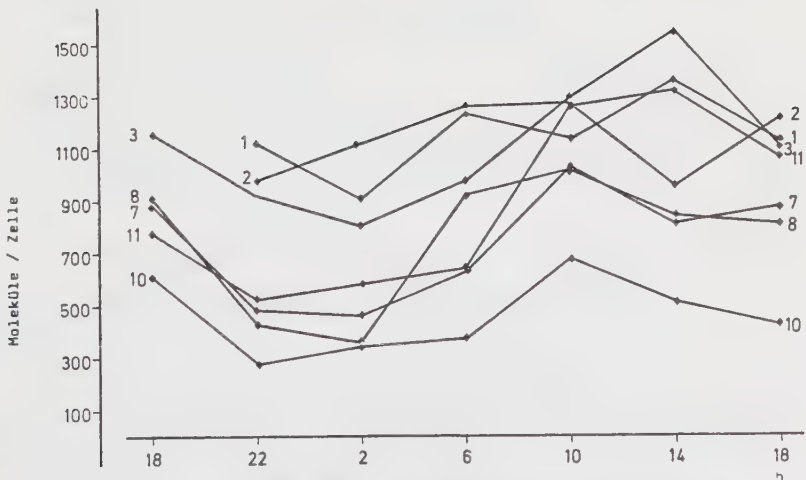


Abb. 3: Circadiane Variation der β -Adrenozeptorendichte an Lymphozyten bei Männern

Abhängigkeit der β -Adrenozeptorendichte an Lymphozyten von der Uhrzeit. Die Rezeptorendichte (B-max) ist in Bindungsstellen/Zelle angegeben. Die Versuche 1,2,3 fanden von April bis Juni, die Versuche 7,8,10, und 11 im Dezember statt.

Bei allen 7 männlichen Versuchspersonen (Abb. 3), zeigt sich ein Verlauf der β -Rezeptorendichte mit einem Gipfel zwischen 10h00 und 14h00 und einem Tiefpunkt zwischen 22h00 und 02h00. Die circadiane Schwankungsbreite variiert inter-individuell zwischen 318 (Proband 2) und 786 (Proband 11) Bindungsstellen/Zelle.

weibliche Versuchspersonen:

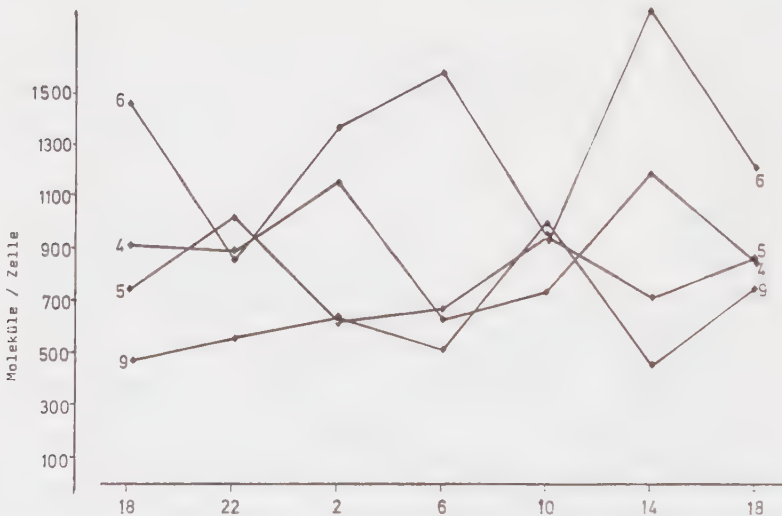


Abb. 4: Circadiane Variation der β -Adrenozeptorendichte an Lymphozyten bei Frauen

Abhängigkeit der β -Adrenozeptorendichte an Lymphozyten der weiblichen Probanden 4,5,6,9 von der Uhrzeit. Die Rezeptorendichte ist in Bindungsstellen/Zelle angegeben. Die Versuche 4,5,6 fanden von Juni bis Juli, der Versuch 9 im Dezember statt.

Im Gegensatz zum eingipfeligen Verlauf der β -Adrenozeptorendichte an Lymphozyten der Männer, zeigen die β -Adrenozeptorendichte an Lymphozyten der weiblichen

Versuchspersonen einen zweigipfeligen Verlauf über 24 Stunden (Abb.4). Neben einem Gipfel zwischen 10h00 und 14h00, der zur selben Zeit liegt wie der Gipfel der Männer, gibt es einen zweiten Gipfel in der Nacht. Dieser liegt zwischen 22h00 und 06h00. Die circadiane Schwankungsbreite variiert inter-individuell zwischen 400 (Probandin 5) und 948 (Probandin 6) Bindungsstellen/Zelle.

3.1.2. Saisonale Unterschiede der β -Adrenozeptorendichte:

Drei Männer (Versuchspersonen 1,2,3) wurden im Zeitraum von April - Mai (Sommer) untersucht, vier Männer (Versuchspersonen 7,8,10,11) im Dezember (Winter), drei Frauen (Versuchspersonen 4,5,6) von Juni - Juli (Sommer), und eine Frau (Versuchsperson 9) im Dezember (Winter).

Männliche Versuchspersonen:

B-max schwankt bei den Probanden um einen stark unterschiedlichen 24 Stunden Mittelwert (Tabelle 3).

Tabelle 3 : 24h Mittelwerte für B-max der Männer

gezeigt ist der 24h-Mittelwert in Moleküle/Zelle als $\bar{x} \pm SE$

Sommer:	Proband	1	2	3	
	B-max	1152 $\pm$ 58	1134 $\pm$ 58	1119 $\pm$ 92	
Winter:	Proband	7	8	10	11
	B-max	745 $\pm$ 81	751 $\pm$ 95	459 $\pm$ 54	885 $\pm$ 122

Zwischen den 24h Mittelwerten der drei Männer (Proband 1,2,3), die im Sommer ($\bar{x} \pm SE$: 1135 $\pm$ 10 Moleküle/Zelle), und der vier Männer (Proband 7,8,10,11), die im Winter untersucht wurden ($\bar{x} \pm SE$: 712 $\pm$ 90 Moleküle/Zelle), besteht ein im t-Test signifikanter Unterschied ($p < 0.01$).

Ein Unterschied in der circadianen Amplitude, mit niedrigeren Werten im Sommer ($\bar{x} \pm SE$: 17.3 ± 6.4 % des Mesor) als im Winter ($\bar{x} \pm SE$: 34.4 ± 4.2 % des Mesor) ist im t-Test ebenfalls signifikant ($p < 0.05$). Die Phasenlage ist nicht verändert (Sommer - 188° , Winter - 189°).

Weibliche Versuchspersonen:

Saisonale Unterschiede für den 24h-Mittelwert sind auch bei den Frauen zu sehen. Im Sommer (Probanden 4,5,6) sind die Werte höher (24h-Mittelwerte in Moleküle / Zelle $\pm SD$: 910 ± 204 , 798 ± 149 , 1311 ± 338), als im Winter (Probandin 9: 625 ± 196).

3.2. Tagesschwankungen der untersuchten physiologischen Variablen bei Männern

Die Messwerte sind relativ zum 24 Stunden-Mittelwert (% des 24h- $\bar{x}$) angegeben, um, trotz saisonaler Einflüsse auf den 24h-Mittelwert, Sommer- und Winterversuche besser zusammenfassen zu können.

3.2.1. Expression der β_2 -Adrenozeptoren an intakten Lymphozyten

3.2.1.1. β_2 -Adrenozeptorendichte

Die β -Adrenozeptorendichte an Lymphozyten der männlichen Versuchspersonen erreicht maximale Werte von 127 ± 6.8 ($\bar{x} \pm SE$) % des 24 Stunden-Mittelwertes von 892 ± 98 um 10h00 und sinkt dann kontinuierlich bis auf einen Tiefpunkt von 73 ± 6.0 % ($\bar{x} \pm SE$) zwischen 22h00 und 02h00, von dem aus sie wieder langsam ansteigt (Abbildung 5).

Die circadiane Variation konnte statistisch gesichert werden. (Anova $p < 0.001$, Populationscosinor $p < 0.0163$). Die circadiane Amplitude betrug 29.6% des Mesor, die circadiane Akrophase 12h32.

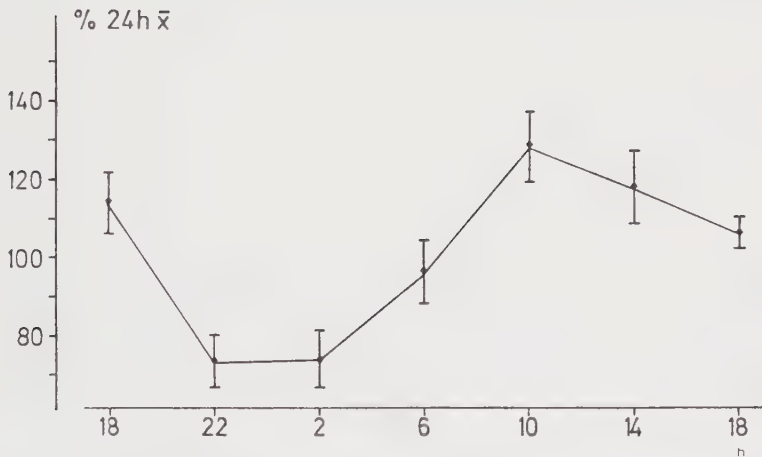


Abb. 5: Circadiane Schwankung der β -Adrenozeptordichte an Lymphozyten bei Männern, aufgetragen in % des 24 Stunden Mittelwertes ($\% 24h-\bar{x}$)

Abhängigkeit der β -Adrenozeptordichte an Lymphozyten (y-Achse) von der Uhrzeit (x-Achse). Aufgetragen sind für jede Uhrzeit die Mittelwerte der Messwerte ($\bar{x} \pm SE$) der 7 Männer in % des 24h-Mittelwertes. 100% entsprechen 892 Bindungsstellen/Zelle.

3.2.1.2. Dissoziationskonstante K-d für (-)-125 J-CYP

Die Dissoziationskonstante K-d für (-)-125 J-CYP der β -Adrenozeptoren an Lymphozyten zeigt bei den männlichen Versuchspersonen ebenfalls eine signifikante circadiane Variation (Anova $p < 0.05$; Populationscosinor $p < 0.005$). Die relativen Werte schwanken zwischen $123 \pm 12.5\%$ 24h- $\bar{x}$ ($\bar{x} \pm SE$) um 10h00, und $70 \pm 6.0\%$ ($\bar{x} \pm SE$) um 22h00 (Abb.6). Die Schätzung der circadianen Rhythmusparameter durch die Populationscosinor Analyse ergab eine circadiane Amplitude von 0.77 pmol/l, die Akrophase liegt bei 12h20.

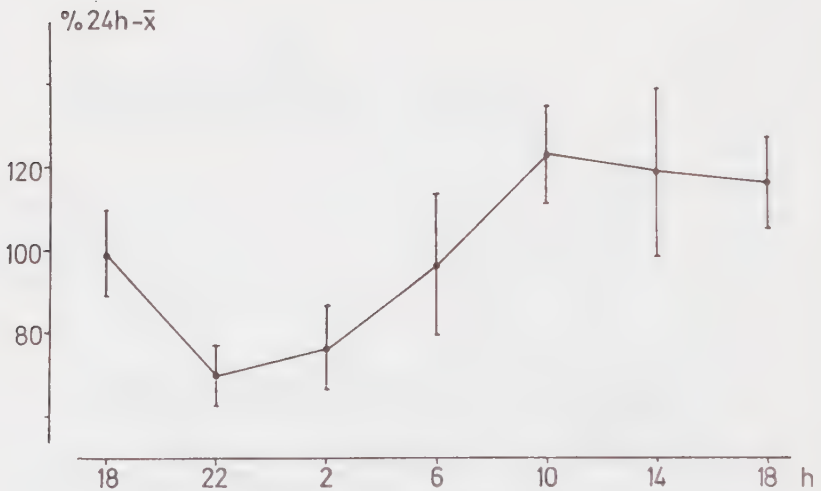


Abb. 6: Circadiane Schwankung der Dissoziationskonstante K-d bei Männern, aufgetragen in % des 24 Stunden Mittelwertes (% 24h- $\bar{x}$)

Circadianer Verlauf der Dissoziationskonstante K-d lymphozytärer β -Adrenozeptoren. Die Messwerte der 7 Männer sind als $\bar{x} \pm SE$ in % des 24h-Mittelwertes (y-Achse) gegen die Uhrzeit (x-Achse) aufgetragen. 100% entsprechen 2.86 pmol/l.

3.2.2. Cortisol Plasmakonzentration

Auch die Cortisolkonzentration im Plasma der Männer zeigt eine signifikante circadiane Variation (Anova $p < 0.001$; Populationscosinor $p < 0.0007$). Die Akrophase für Cortisol wird mit 11h44, die circadiane Amplitude mit $8.6 \mu\text{g/dl}$ Plasma geschätzt. Die relative Cortisolkonzentration erreicht ein Maximum von $184 \pm 15.5 \% 24\text{h-}\bar{x}$ ($\bar{x} \pm \text{SE}$) um 10h00, fällt kontinuierlich bis zu einem Minimum von $23 \pm 3.8 \% 24\text{h-}\bar{x}$ ($\bar{x} \pm \text{SE}$) um 02h00, um dann wieder anzusteigen (Abb.7).

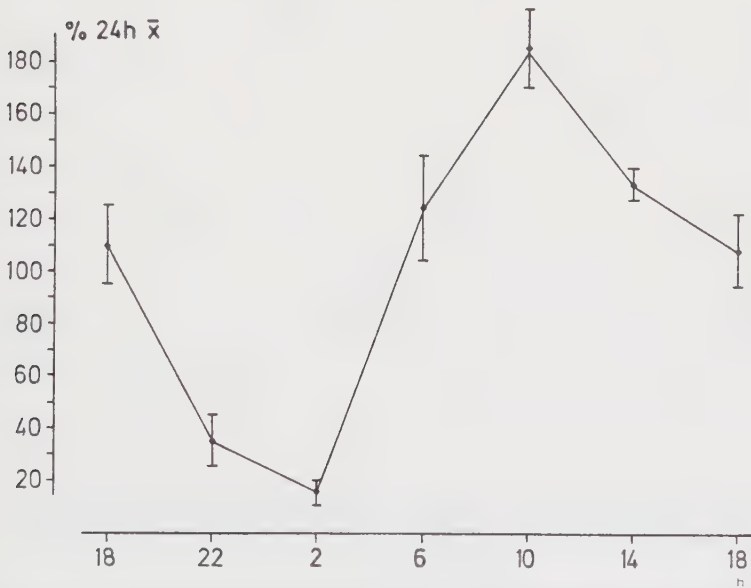


Abb. 7: Circadiane Schwankung der Cortisolkonzentration bei Männern, aufgetragen in % des 24 Stunden Mittelwertes (% 24h- $\bar{x}$)

Verlauf der Mittelwerte der Cortisolkonzentration im Plasma der Männer ($\bar{x} \pm \text{SE}$, $n=7$) in % des 24h-Mittelwertes (y-Achse) über 24 Stunden (Uhrzeit x-Achse). 100 % entsprechen $11.1 \mu\text{g/dl}$ Plasma.

3.2.3. Lymphozyten-, Leukozyten- und Granulozytenzahl

3.2.3.1. Lymphozyten:

Die Lymphozytenzahl der Männer zeigt eine signifikante circadiane Variation (Anova $p < 0.01$). Sie erreicht ein Maximum von 126 ± 5.7 % $24h-\bar{x}$ ($\bar{x} \pm SE$) um 02h00, fällt dann kontinuierlich ab bis auf 81 ± 7.2 % $24h-\bar{x}$ ($\bar{x} \pm SE$) um 10h00. Danach steigen die Werte wieder langsam an (Abb.8).

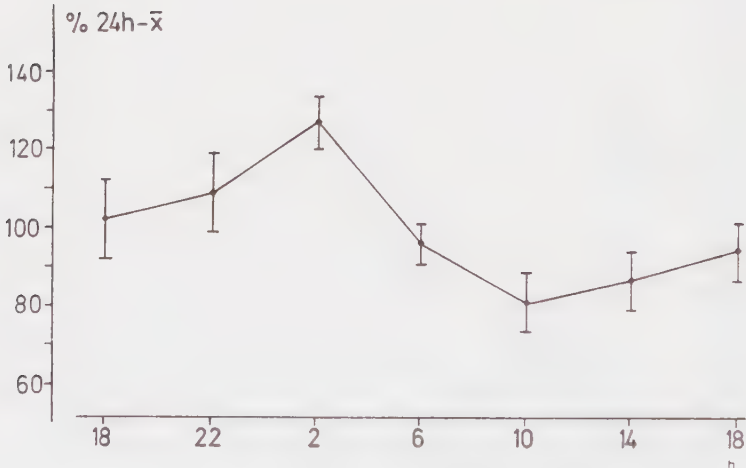


Abb. 8: Circadiane Schwankung der Lymphozytenzahl bei Männern, aufgetragen in % des 24 Stunden Mittelwertes (% $24h-\bar{x}$)
Verlauf der Mittelwerte der Lymphozytenzahl der Männer ($\bar{x} \pm SE$, $n=6$) in % des 24h-Mittelwertes (y-Achse) über 24 Stunden (Uhrzeit x-Achse). 100% entsprechen 2685 Zellen/ μ l Blut.

3.2.3.2. Leukozyten:

Die Zahl der Leukozyten der Männer zeigt eine ähnliche signifikante circadiane Variation (Anova $p < 0.001$; Populationscosinor $p < 0.01$). Die Akrophase wird mit 23h12, die circadiane Amplitude mit 887 Zellen/ μ l Blut geschätzt. Die relativen Werte erreichen ein Maximum zwischen 22h00 mit $113 \pm 3.2 \% 24h-\bar{x}$ ($\bar{x} \pm SE$) und 02h00 mit $112 \pm 5.9 \% 24h-\bar{x}$ ($\bar{x} \pm SE$), und fallen dann kontinuierlich bis zu einem Minimum mit Werten von $85 \pm 4.5 \% 24h-\bar{x}$ ($\bar{x} \pm SE$) um 10h00 (Abb.9).

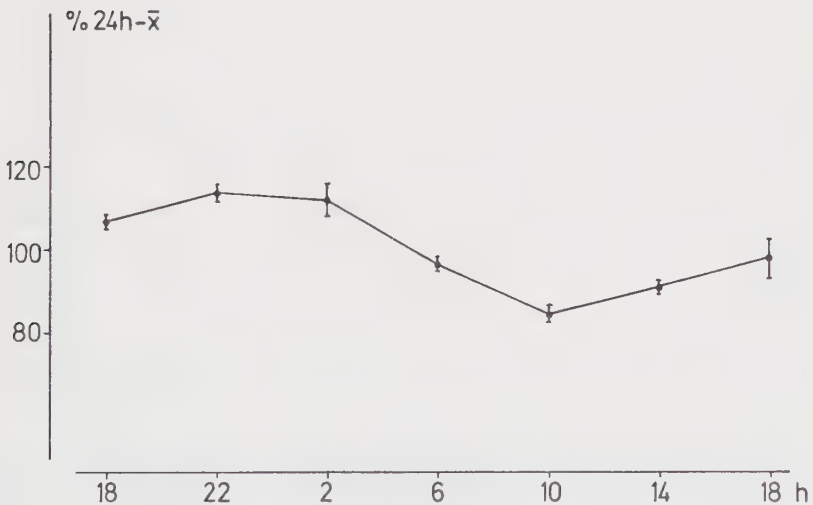


Abb. 9: Circadiane Schwankung der Leukozytenzahl bei Männern, aufgetragen in % des 24 Stunden Mittelwertes (% 24h- $\bar{x}$)

Verlauf der Mittelwerte der Leukozytenzahl der Männer ($\bar{x} \pm SE$, $n=6$) in % des 24h-Mittelwertes (y-Achse) über 24 Stunden (Uhrzeit x-Achse). 100% entsprechen 6123 Zellen/ μ l Blut.

3.2.3.3. Neutrophile Granulozyten:

Auch die Zahl der neutrophilen Granulozyten zeigt bei den Männern eine signifikante circadiane Variation (Anova $p < 0.05$).

Die Granulozytenzahl folgt über 24 Stunden im Verlauf der der Lymphozyten- (Maximum 02h00) und der Leukozytenzahl (Maximum 22h00-02h00). Sie erreicht ein Maximum von 115 ± 4.5 % $24h-\bar{x}$ ($\bar{x} \pm SE$) bereits um 22h00 und ein Minimum von 88 ± 4.2 % $24h-\bar{x}$ ($\bar{x} \pm SE$) um 10h00 (Abb.10).

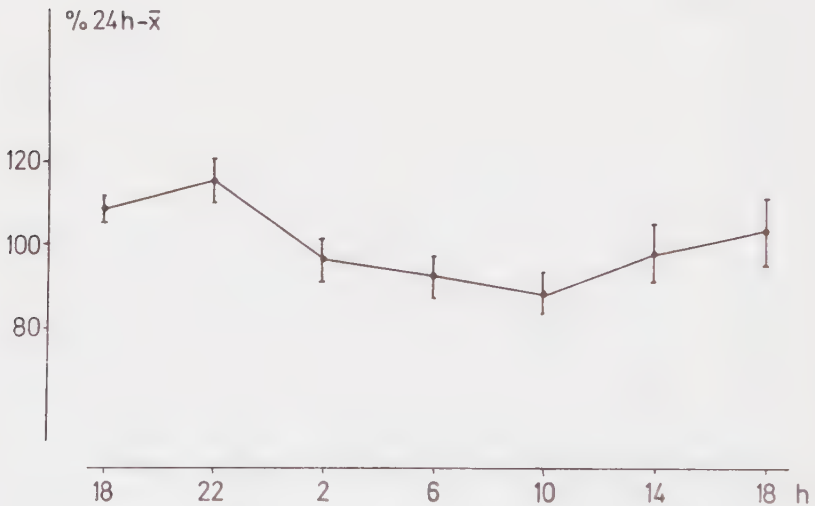


Abb. 10: Circadiane Schwankung der Granulozytenzahl bei Männern, aufgetragen in % des 24 Stunden Mittelwertes (% $24h-\bar{x}$)

Verlauf der Mittelwerte der Zahl der neutrophilen Granulozyten der Männer ($\bar{x} \pm SE$, $n=6$) in % des $24h$ -Mittelwertes (y-Achse) über 24 Stunden (Uhrzeit x-Achse). 100 % entsprechen 3151 Zellen/ μ l Blut.

3.2.4. Blutdruck und Puls:

3.2.4.1. Systolischer Blutdruck:

Der systolische Blutdruck der männlichen Versuchspersonen zeigt eine signifikante circadiane Variation (Anova $p < 0.001$; Populationscosinor $p < 0.05$). Die circadiane Amplitude beträgt 7.0 mmHg, die Akrophase lag um 17h08. Der circadiane Verlauf des systolischen Blutdrucks zeigt ein Plateau zwischen 10h00 und 22h00 und ein wannenförmiges Minimum zwischen 01h00 und 07h00 (Abb. 11).

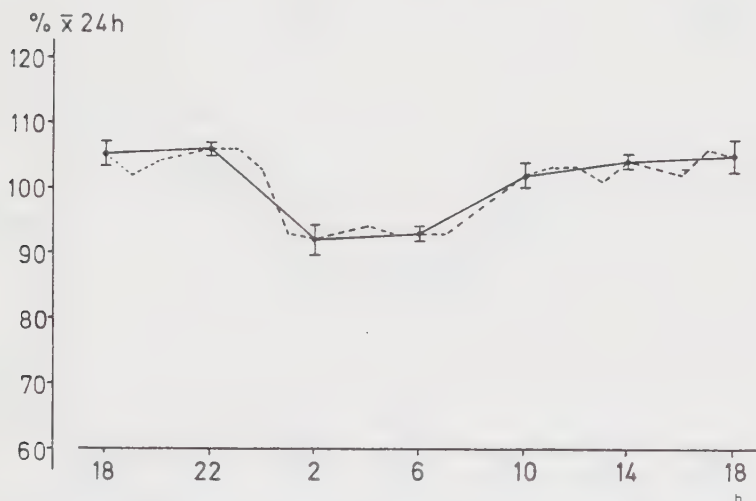


Abb. 11: Circadiane Schwankung des systolischen Blutdrucks bei Männern, aufgetragen in % des 24 Stunden Mittelwertes ($\% 24h-\bar{x}$)

Verlauf der Mittelwerte des systolischen Blutdrucks der Männer ($\bar{x} \pm SE$, $n=7$) in % des 24h-Mittelwertes (y-Achse) über 24 Stunden (Uhrzeit x-Achse). 100% entsprechen 114.3 mmHg, die Werte schwanken zwischen $92 \pm 3.8 \%$ und $106 \pm 1.5 \%$ ($\bar{x} \pm SE$). Die durchgezogene Linie verbindet die Messungen zu den 7 Blutentnahmeterminen. Diese Werte sind als $\bar{x} \pm SE$ angegeben. Die gestrichelte Kurve verbindet die stündlichen Messungen. Aus Gründen der Uebersichtlichkeit ist bei dieser Kurve die Streuung nicht aufgetragen.

3.2.4.2. Diastolischer Blutdruck:

Der diastolische Blutdruck der Männer folgt einem ähnlichen Verlauf wie der systolische Blutdruck (Anova $p < 0.001$; Populationscosinor $p < 0.01$). Die Akrophase liegt bei 16h48, die circadiane Amplitude beträgt 8.0 mmHg. Ausgedrückt in relativen Werten besteht von ca. 12h00 bis 22h00 ein plateauförmiges Maximum, und von 01h00 bis 06h00 ein wannenförmiges Minimum. Die Werte schwanken zwischen 111 ± 4.9 %24h- $\bar{x}$ und 86 ± 2.3 %24h- $\bar{x}$ ($\bar{x} \pm SE$) (Abb.12).

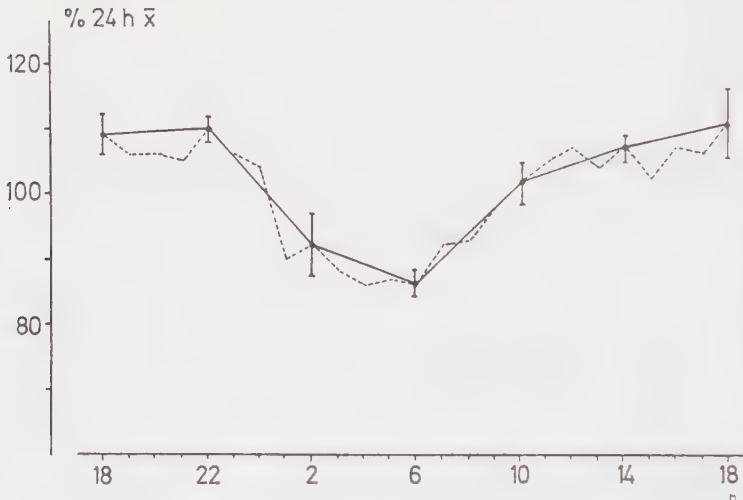


Abb. 12: Circadiane Schwankung des diastolischen Blutdrucks bei Männern, aufgetragen in % des 24 Stunden Mittelwertes (% 24h- $\bar{x}$)

Verlauf der Mittelwerte des diastolischen Blutdrucks der Männer ($\bar{x} \pm SE$, $n=7$) in % des 24h-Mittelwertes (y-Achse) über 24 Stunden (Uhrzeit x-Achse). 100% entsprechen 69.9 mmHg. Die durchgezogene Linie verbindet die Messungen zu den Blutentnahmetermen. Diese Werte sind als $\bar{x} \pm SE$ angegeben. Die gestrichelte Kurve verbindet die stündlichen Messungen. Aus Gründen der Uebersichtlichkeit ist für diese Kurve die Streuung nicht aufgetragen

3.2.4.3. Arterieller Mitteldruck

Der mittlere arterielle Blutdruck zeigt bei den Männern ebenfalls eine signifikante circadiane Variation. (Anova $p < 0.001$; Populationscosinor $p < 0.01$) Die circadiane Amplitude beträgt 6.5 mmHg, die Akrophase liegt bei 17h24. Hohe Werte werden zwischen 09h00 und 00h00 erreicht, niedrige zwischen 01h00 und 08h00. Ausgedrückt in relativen Werten zeigt der arterielle Mitteldruck eine circadiane Schwankungsbreite von 108 ± 2 bis 85 ± 3 % $24h-\bar{x}$ ($\bar{x} \pm SE$) (Abb.13)

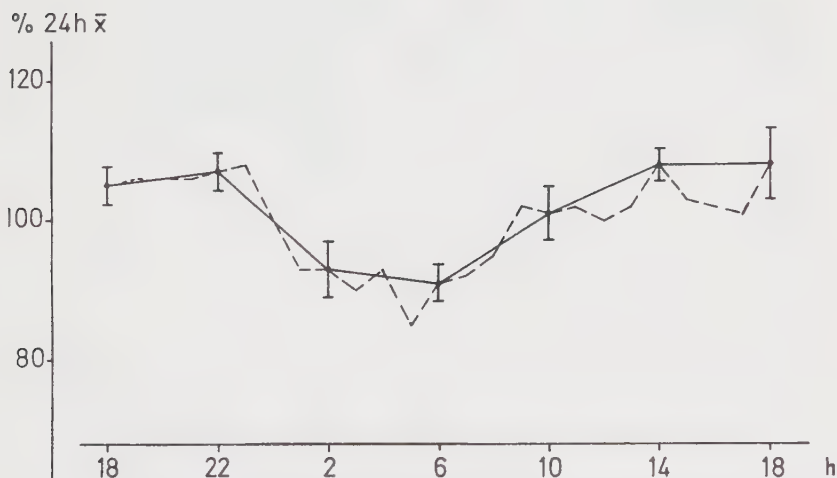


Abb. 13: Circadiane Schwankung des arteriellen Mitteldrucks bei Männern, aufgetragen in % des 24 Stunden Mittelwertes (% $24h-\bar{x}$)

Verlauf der Mittelwerte des arteriellen Mitteldrucks der Männer ($\bar{x} \pm SE$, $n=7$) in % des 24h-Mittelwertes (y-Achse) über 24 Stunden (Uhrzeit x-Achse). 100% entsprechen 87.7 mmHg. Die durchgezogene Linie verbindet die Messungen zu den Blutentnahmeterminen. Diese Werte sind als $\bar{x} \pm SE$ angegeben. Die gestrichelte Kurve verbindet die stündlichen Messungen. Aus Gründen der Uebersichtlichkeit ist für diese Kurve die Streuung nicht aufgetragen.

3.2.4.4. Puls

Der Puls der 7 Männer zeigt eine deutliche circadiane Schwankung (Anova $p < 0.001$; Populationscosinor $p < 0.01$). Die Akrophase liegt bei 16h04, die circadiane Amplitude beträgt 8.2 1/Minute. Der relative Puls erreicht ein breites Maximum von ca. 09h00 bis 22h00, fällt kontinuierlich bis zu einem Minimum von ca. 03h00 bis 06h00, und steigt dann wieder steil an. Die Werte schwanken zwischen $81 \pm 6.8 \%$ $24h-\bar{x}$ und $113 \pm 2.3 \%$ $24h-\bar{x}$ ($\bar{x} \pm SE$) (Abb.14).

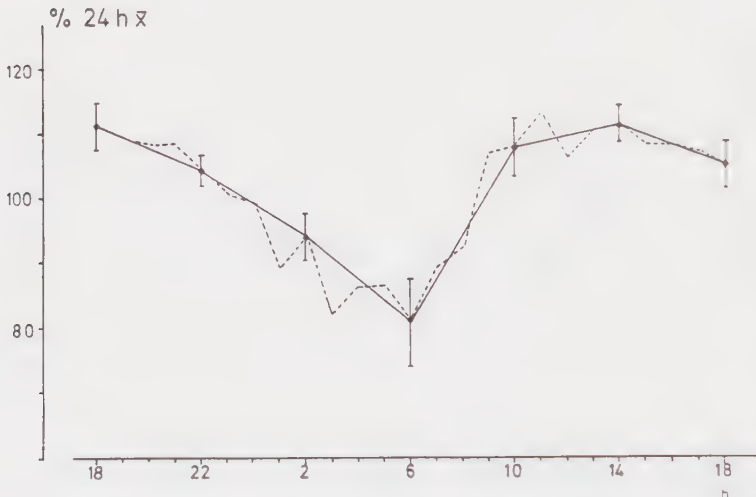


Abb. 14: Circadiane Schwankung des Puls bei Männern, aufgetragen in % des 24 Stunden Mittelwertes (% $24h-\bar{x}$)

Verlauf der Mittelwerte des Puls der Männer ($\bar{x} \pm SE$, $n=7$) in % des 24h-Mittelwertes (y-Achse) über 24 Stunden (x-Achse: Uhrzeit). 100 % entsprechen einer Pulsfrequenz von 72.7. Die durchgezogene Linie verbindet die Messungen zu den 7 Blutentnahmeterminen. Diese Werte sind als $\bar{x} \pm SE$ angegeben. Die gestrichelte Kurve verbindet die Mittelwerte der stündlichen Messungen. Aus Gründen der Uebersichtlichkeit ist für diese Kurve die Streuung nicht aufgetragen.

3.2.5. Korrelationen zwischen den physiologischen Variablen:

Die Dichte der β_2 -Adrenozeptoren an intakten, menschlichen Lymphozyten ist **positiv** korreliert mit der Plasmakonzentration von Cortisol ($p < 0.01$) und **negativ** korreliert mit der Zahl der Lymphozyten ($p < 0.01$), Leukozyten ($p < 0.05$), und der neutrophilen Granulozyten (nicht signifikant).

Zu den Kreislaufparametern Blutdruck und Puls ist eine **positive** Korrelation unter Berücksichtigung einer Phasenverzögerung zu B-max von 4 Stunden signifikant nachweisbar (systolischer ($p < 0.01$), diastolischer Blutdruck ($p < 0.01$), arteriellen Mitteldruck ($p < 0.001$) und Puls ($p < 0.05$).

Die circadiane Amplitude der Rezeptorendichte ist **negativ** mit der circadianen Amplitude des diastolischen Blutdruckes ($p < 0.01$) und des mittleren Blutdrucks ($p < 0.05$) korreliert .

3.3. Tagesschwankungen der untersuchten physiologischen Variablen der Frauen

Die Messwerte sind auch beim Vergleich innerhalb der Gruppe der weiblichen Versuchspersonen relativ zum 24 Stunden-Mittelwert angegeben, da auch bei Frauen Hinweise auf saisonale Einflüsse auf den 24 Stunden-Mittelwert bestehen (vgl. 3.1.2)

3.3.1. Expression der β_2 -Adrenozeptoren an intakten Lymphozyten

3.3.1.1. β_2 -Adrenozeptorendichte

Die β -Adrenozeptorendichte an Lymphozyten zeigt gemittelt bei Frauen keine signifikanten circadianen Variationen. Aufgetragen gegen die Uhrzeit erreicht sie innerhalb von 24 Stunden zwei nur gering ausgeprägte Gipfel um 02h00 und zwischen 10h00 und 14h00 (Abb.15).

3.3.1.2. Dissoziationskonstante K-d für (-)-125 J-CYP

Die Dissoziationskonstante K-d für (-)-125-Jodozyanopindolol von β -Adrenozeptoren an Lymphozyten zeigt bei den weiblichen Versuchspersonen ebenfalls keine signifikante circadiane Variation. Aufgetragen als relative Werte in % des 24h- $\bar{x}$ gegen die Uhrzeit ergibt sich ein zweigipfelter Verlauf mit nur gering ausgeprägten Maxima um 22h00 und von 14h00 bis 18h00 (Abb.16).

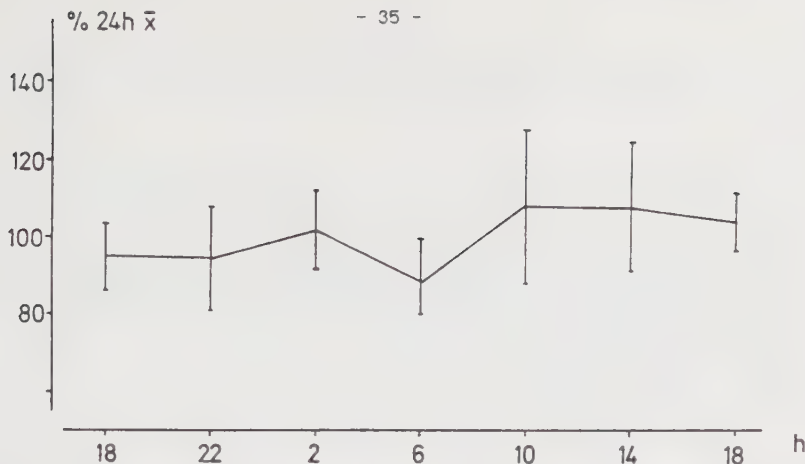


Abb. 15: Circadiane Schwankung der β -Adrenozeptorendichte an Lymphozyten bei Frauen, aufgetragen in % des 24 Stunden Mittelwertes (% 24h- $\bar{x}$)

Abhängigkeit der β -Adrenozeptorendichte an Lymphozyten (y-Achse) von der Uhrzeit (x-Achse). 100% entsprechen 911 Bindungsstellen/Zelle. Aufgetragen sind für jede Uhrzeit der Mittelwert der Messwerte ($\bar{x} \pm SE$) der 4 Frauen in % 24h- $\bar{x}$.

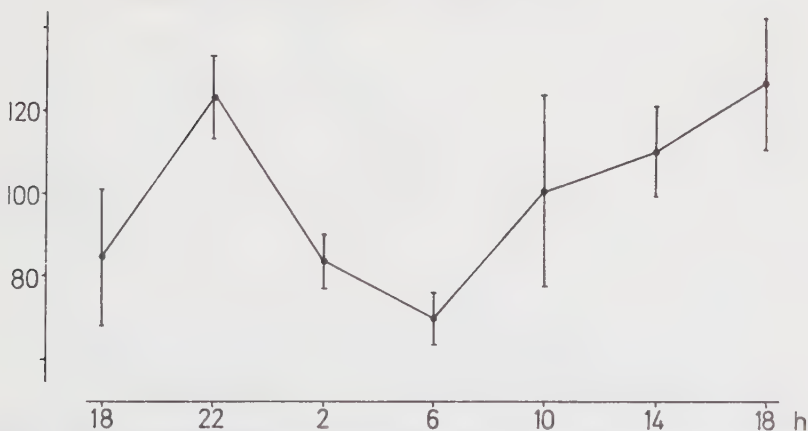


Abb. 16: Circadiane Schwankung der Dissoziationskonstante K-d bei Frauen, aufgetragen in % des 24 Stunden Mittelwertes (% 24h- $\bar{x}$)

Verlauf der Mittelwerte der Dissoziationskonstante K-d der β -Adrenozeptoren an Lymphozyten für 125 J-CYP bei Frauen ($\bar{x} \pm SE$, n=4). Die Werte sind in % des 24h-Mittelwertes angegeben (y-Achse) und gegen die Uhrzeit (x-Achse) aufgetragen. 100% entsprechen 3.49 pmol/l.

3.3.2. Cortisol Plasmakonzentration

Die Cortisolkonzentration im Plasma zeigt hingegen auch bei den Frauen eine signifikante circadiane Variation (Anova $p < 0.001$). Die relative Konzentration erreicht ein Maximum von 186 ± 25 % $24h-\bar{x}$ ($\bar{x} \pm SE$) um 10h00, fällt kontinuierlich bis zu einem Minimum von 40 ± 9.0 % $24h-\bar{x}$ ($\bar{x} \pm SE$) um 22h00, um dann wieder anzusteigen (Abb.17)

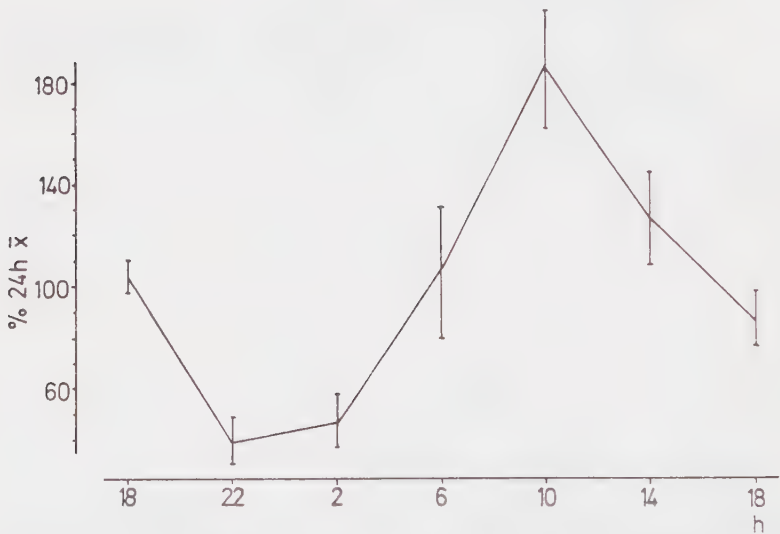


Abb. 17: Circadiane Schwankung der Cortisolkonzentration bei Frauen, aufgetragen in % des 24 Stunden Mittelwertes (% $24h-\bar{x}$)

Abhängigkeit der Cortisolkonzentration im Plasma (y-Achse) von der Uhrzeit (x-Achse). Aufgetragen sind die Mittelwerte der Messungen zu einer Uhrzeit ($\bar{x} \pm SE$) der 4 Frauen in % des $24h$ -Mittelwertes. 100 % entsprechen $15.6 \mu g/dl$ Plasma.

3.3.3. Lymphozyten-, Leukozyten-, und Granulozytenzahl

3.3.3.1. Lymphozyten:

Die Lymphozytenzahl im peripheren venösen Blut zeigt bei den Frauen eine signifikante circadiane Variation (Anova $p < 0.05$). Aufgetragen in % des 24h- $\bar{x}$ erreicht sie ein Maximum von 123 ± 13 % 24h- $\bar{x}$ ($\bar{x} \pm SE$) um 02h00, fällt dann kontinuierlich ab bis auf 80 ± 6 % 24h- $\bar{x}$ ($\bar{x} \pm SE$) um 10h00, und steigt danach wieder an (Abb.18).

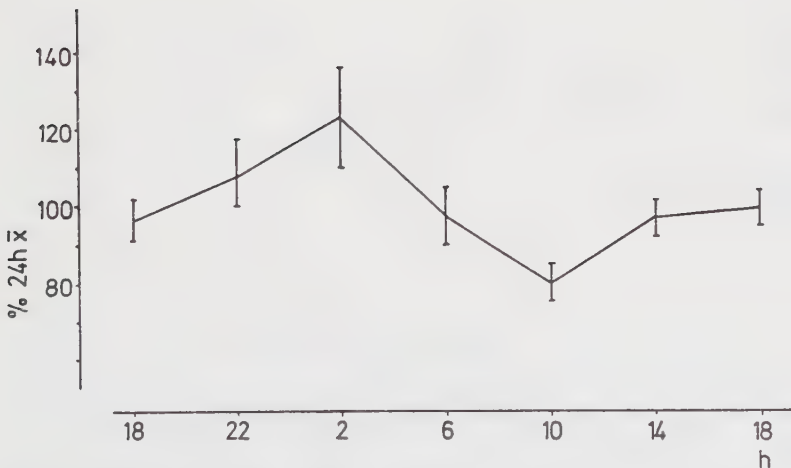


Abb. 18: Circadiane Schwankung der Lymphozytenzahl bei Frauen, aufgetragen in % des 24 Stunden Mittelwertes (% 24h- $\bar{x}$)

Verlauf der Mittelwerte der Lymphozytenzahl in % des 24h-Mittelwertes (y-Achse) über 24 Stunden (x-Achse: Uhrzeit). 100% entsprechen 2904 Zellen/ μ l Blut. Aufgetragen sind die Ergebnisse der 4 Frauen ($\bar{x} \pm SE$).

3.3.3.2. Leukozyten:

Die Zahl der Leukozyten zeigt bei den Frauen eine signifikante circadiane Variation (Anova $p < 0.01$). Sie erreicht ein Maximum um 02h00 mit 114 ± 7 % $24h-\bar{x}$ ($\bar{x} \pm SE$), fällt dann kontinuierlich bis zu einem Minimum von 91 ± 4 % $24h-\bar{x}$ ($\bar{x} \pm SE$) um 10h00, um danach wieder langsam anzusteigen (Abb. 19).

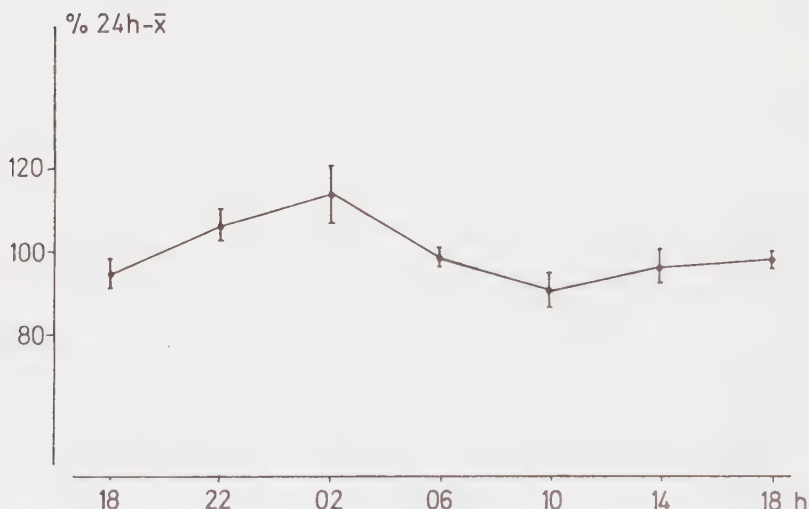


Abb. 19: Circadiane Schwankung der Leukozytenzahl bei Frauen, aufgetragen in % des 24 Stunden Mittelwertes (% $24h-\bar{x}$)

Verlauf der Mittelwerte der Leukozytenzahl bei Frauen ($\bar{x} \pm SE$, $n=4$) in % des 24h-Mittelwertes (y-Achse) über 24 Stunden (Uhrzeit x-Achse). 100% entsprechen 6931 Zellen/ μ l Blut.

3.3.3.3. Neutrophile Granulozyten:

Die Zahl der neutrophilen Granulozyten zeigt bei den Frauen eine signifikante circadiane Variation (Populationscosinor für absolute Daten $p < 0.05$). Die circadiane Amplitude beträgt 212 Zellen/ μ l, die Akrophase liegt bei 04h36. Die relative Granulozytenzahl folgt über 24 Stunden im Verlauf der der Lymphozyten- (Maximum 02h00) und der Leukozytenzahl (Maximum 02h00). Sie erreicht ein Maximum von 107 ± 7 % 24h- $\bar{x}$ ($\bar{x} \pm SE$) um 02h00, ein Minimum von 89 ± 5 % 24h $\bar{x}$ ($\bar{x} \pm SE$) aber, später als die anderen Zelltypen, erst um 18h00 (Abb.20).

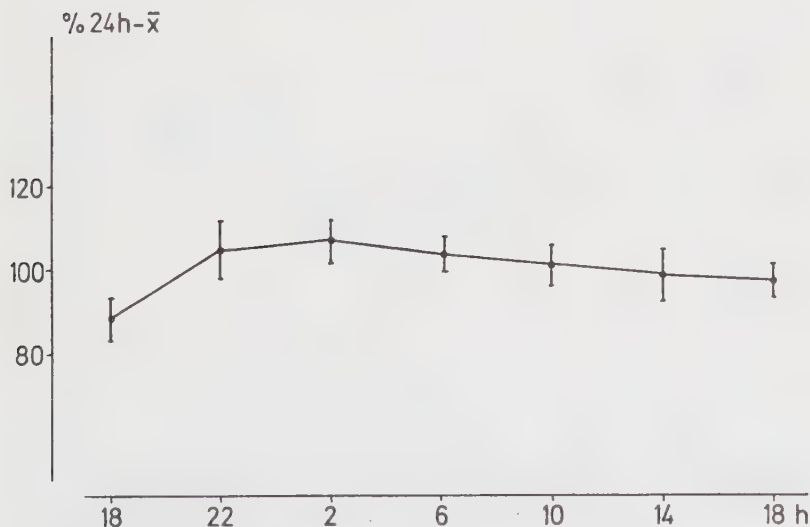


Abb. 20: Circadiane Schwankung der Granulozytenzahl bei Frauen, aufgetragen in % des 24 Stunden Mittelwertes (% 24h- $\bar{x}$)

Verlauf der Mittelwerte der Granulozytenzahl bei Frauen ($\bar{x} \pm SE$, $n=4$) in % des 24h-Mittelwertes (y-Achse) über 24 Stunden (Uhrzeit x-Achse). 100 % entsprechen 3628 Zellen/ μ l Blut.

3.3.4 Blutdruck und Puls

3.3.4.1. Systolischer Blutdruck:

Der systolische Blutdruck der Frauen zeigt eine signifikante circadiane Variation (Anova $p < 0.001$). Der circadiane Verlauf des relativen systolischen Blutdrucks hält sich auf einem Plateau zwischen 10h00 und 00h00 und sinkt in der Nacht bis auf ein Minimum um 06h00, die Werte schwanken zwischen $86 \pm 3 \%$ und $108 \pm 2 \%$ ($\bar{x} \pm SE$) (Abb.21).

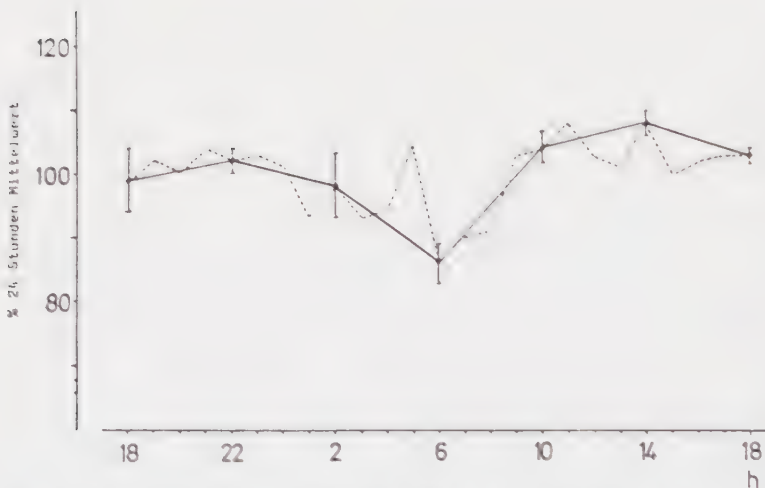


Abb. 21: Circadiane Schwankung des systolischen Blutdrucks bei Frauen, aufgetragen in % des 24 Stunden Mittelwertes ($\% 24h-\bar{x}$)

Circadianer Verlauf der Mittelwerte des systolischen Blutdrucks bei Frauen ($n=4$) in % des 24h-Mittelwertes ($\% 24h-\bar{x} = y$ -Achse; Uhrzeit = x -Achse). 100% entsprechen 105.3 mmHg. Die durchgezogene Linie verbindet die Messungen zu den Blutentnahmeterminen. Diese Werte sind als $\bar{x} \pm SE$ angegeben. Die gestrichelte Kurve verbindet die stündlichen Messungen. Aus Gründen der Uebersichtlichkeit ist die Streuung bei dieser Kurve nicht aufgetragen.

3.3.4.2. Diastolischer Blutdruck:

Der diastolische Blutdruck der Frauen zeigt aufgetragen gegen die Uhrzeit folgt einem ähnlichen signifikanten Verlauf wie der systolische Blutdruck (Anova $p < 0.001$). Von 09h00 bis 23h00 besteht ein plateauartiges Maximum, von 00h00 bis 08h00 ein Minimum. Ausgedrückt in % des $24h-\bar{x}$ schwanken die Werte zwischen $111 \pm 1\% \ 24h-\bar{x}$ und $88 \pm 3.5\% \ 24h-\bar{x}$ ($\bar{x} \pm SE$) (Abb.22).

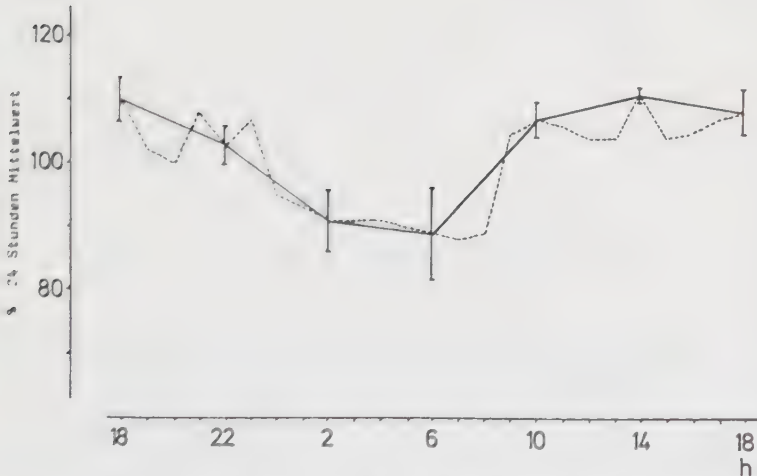


Abb. 22: Circadiane Schwankung des diastolischen Blutdrucks bei Frauen, aufgetragen in % des 24 Stunden Mittelwertes ($\% \ 24h-\bar{x}$)

Verlauf der Mittelwerte des diastolischen Blutdrucks der Frauen ($n=4$) in % des $24h$ -Mittelwertes (y -Achse) über 24 Stunden (Uhrzeit x -Achse). 100% entsprechen 63.8 mmHg. Die durchgezogene Linie verbindet die Messungen zu den Blutentnahmetermi-
nen. Diese Werte sind als $\bar{x} \pm SE$ angegeben. Die gestrichelte Kurve verbindet die stündlichen Messungen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist bei dieser Kurve die Streuung nicht aufgetragen

3.3.4.3. Arterieller Mitteldruck

Der mittlere arterielle Blutdruck der Frauen zeigt ebenfalls eine signifikante circadiane Variation. (Anova $p < 0.001$). Hohe Werte werden zwischen 09h00 und 00h00 erreicht, niedrige zwischen 01h00 und 08h00. Ausgedrückt in % des 24h- $\bar{x}$ schwanken die Werte zwischen 110 ± 0.9 % 24h- $\bar{x}$ und 88 ± 5.3 % 24h- $\bar{x}$ ($\bar{x} \pm SE$) (Abb. 23).

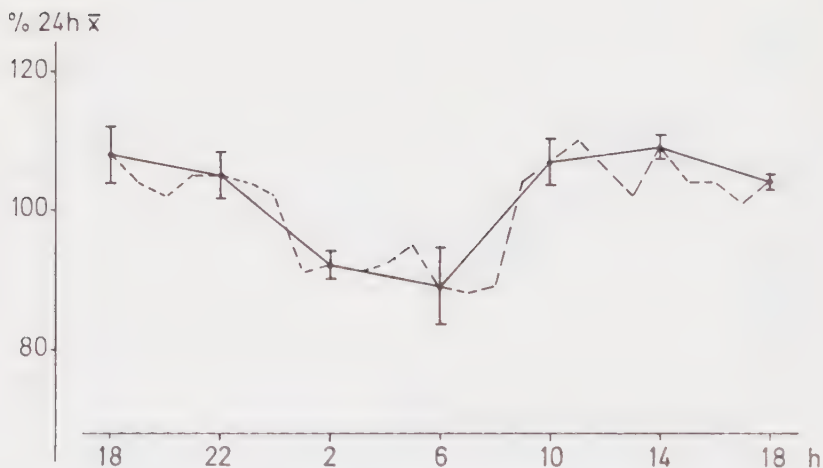


Abb. 23: Circadiane Schwankung des arteriellen Mitteldrucks bei Frauen, aufgetragen in % des 24 Stunden Mittelwertes (% 24h- $\bar{x}$)

Verlauf der Mittelwerte des arteriellen Mitteldrucks der Frauen ($n=4$) in % des 24h-Mittelwertes (y-Achse) über 24 Stunden (Uhrzeit x-Achse). 100% entsprechen 81.5 mmHg. Die durchgezogene Linie verbindet die Messungen zu den Blutentnahmeterminen. Diese Werte sind als $\bar{x} \pm SE$ angegeben. Die gestrichelte Kurve verbindet die Mittelwerte der stündlichen Messungen. Aus Gründen der Uebersichtlichkeit ist bei dieser Kurve die Streuung nicht aufgetragen.

3.3.4.4. Puls

Die Messwerte des Puls der 4 Frauen zeigen keine signifikante circadiane Variation. Ausgedrückt in % des 24h-x erreichen sie zwar ein Maximum um 10h00 mit 114 ± 2.5 % $24h-\bar{x}$ und ein Minimum um 07h00 mit 85 ± 5.0 % $24h-\bar{x}$ ($\bar{x} \pm SE$). Die Werte zeigen aber keinen kontinuierlichen Verlauf (Abb.24).

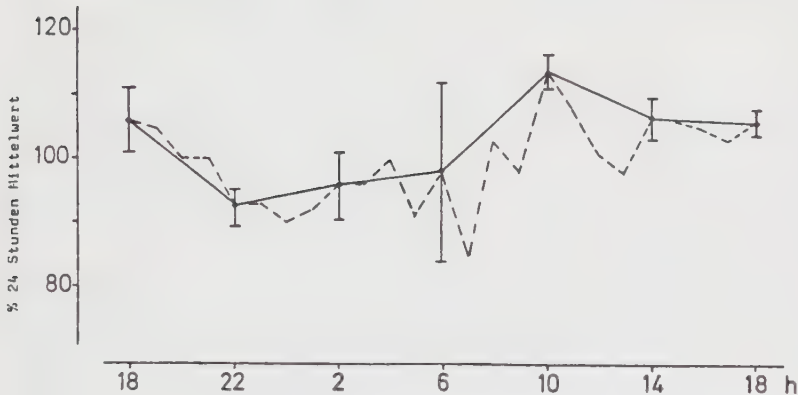


Abb. 24: Circadiane Schwankung des Puls bei Frauen, aufgetragen in % des 24 Stunden Mittelwertes (% $24h-\bar{x}$)

Circadianer Verlauf des Puls bei Frauen ($n=4$) in % $24h-\bar{x}$ (=y-Achse, x-Achse=Uhrzeit). 100 % entsprechen einer Frequenz von 73 /Minute. Die durchgezogene Linie verbindet die Messungen zu den Blutentnahmeterminen. Diese Werte sind als $\bar{x} \pm SE$ angegeben. Die gestrichelte Kurve verbindet die stündlichen Messungen. Aus Gründen der Uebersichtlichkeit ist bei dieser Kurve die Streuung nicht aufgetragen.

3.3.5. Korrelationen zwischen den physiologischen Variablen:

Die Dichte der β -Adrenozeptoren an Lymphozyten korreliert in der Frauengruppe weder mit der Cortisolkonzentration, der Zahl der Lymphozyten, Leukozyten oder neutrophilen Granulozyten, noch mit den Kreislaufparametern.

4. DISKUSSION

4.1. Circadiane Veränderungen

4.1.1. Circadiane Schwankungen des Blutdrucks, des Puls, der Cortisolkonzentration und der Zahl der weißen Blutzellen

Circadiane Schwankungen des Blutdrucks sind seit langem bekannt und wurden von vielen Autoren beschrieben (17,28,29,31,33,43,47,54,60,63). Der Blutdruck über 24 Stunden zeigt hohe Werte tagsüber und ein nachtlisches Tief. Die Herzfrequenz verhält sich entsprechend (43,47,63). Die Ergebnisse dieser Arbeit (Abb.11-14, Abb.21-24) gleichen den in der Literatur beschriebenen. Blutdruck und Puls sämtlicher Versuchspersonen zeigen ein nachtlisches Tief und hohe Werte während des Tages.

Die gefundenen circadianen Schwankungen der Cortisolkonzentration mit maximalen Werten um 10h00 und minimalen Werten um 02h00, stimmen mit dem in der Literatur beschriebenen circadianen Rhythmus (3,19,26,51,61), mit maximalen Werten gegen 08h00 und minimalen Werten gegen 00h00, überein. Es ist hierbei zu berücksichtigen, daß in der vorliegenden Arbeit keine Messungen um 08h00 bzw. um 00h00 sondern um 06h00 und um 10h00 bzw. um 22h00 und um 02h00 stattfanden. Ein mögliches Maximum um 08h00 und entsprechend auch ein Minimum um 00h00 könnten so nicht dargestellt worden sein. (siehe Abb.7 und 17).

Der Verlauf der Lymphozytenzahl mit einem Maximum um 02h00 (Abb.8 und 18) entspricht dem in der Literatur beschriebenen circadianen Rhythmus mit Maxima in der Nacht zwischen 00h00 und 02h00 (1,30,42,51). Die gefundene negative Beziehung von Cortisolkonzentration und Lymphozytenzahl deckt sich ebenfalls mit veröffentlichten Daten (51).

Aehnlich verhält es sich für die Zahl der Leukozyten (Abb.9 und 19) und der Granulozyten (Abb.10 und 20), deren hier gezeigte nächtliche Maxima auch von anderen Arbeitsgruppen (51) gefunden wurde.

Sowohl bei Blutdruck, Puls, Cortisol, als auch für die weißen Blutzellen finden sich keine Unterschiede der circadianen Schwankungen zwischen Männern und Frauen.

4.1.2. Circadiane Schwankungen an β -Adrenozeptoren intakter Lymphozyten

Die ausgeprägten Unterschiede des circadianen Verlaufs der β -Adrenozeptorwerte zwischen Männern und Frauen (Abb.5 und 15) machen es unumgänglich, diese in der weiteren Diskussion getrennt zu behandeln (vgl. Kapitel 3.1.).

Ueber mögliche Ursachen dieses Unterschiedes kann nur spekuliert werden. Andere Arbeitsgruppen fanden keinen Unterschied der β -Adrenozeptorendichte an Lymphozyten zwischen Männern und Frauen (46). Dabei wurden allerdings keine tageszeitlichen Einflüsse berücksichtigt. Sexualhormone beeinflussen die β -Adrenozeptorendichte (34), möglicherweise ist der zweite Peak in der Nacht (Abb.15) abhängig vom Menstruationszyklus. Wegen der zu geringen Zahl der weiblichen Versuchspersonen, kann in dieser Arbeit hierfür keine Antwort gegeben werden.

Da Blutdruck, Puls, Cortisol, und die Zahl der weißen Blutzellen weder bei Frauen noch bei Männern zweigipfelige Verläufe zeigen, beziehen sich Vergleiche zur β -Adrenozeptorendichte in der folgenden Diskussion nur auf die Ergebnisse an Männern.

Die in dieser Arbeit gefundene circadiane Schwankung der β -Adrenozeptorendichte an menschlichen Lymphozyten (Abb.5 und 6) kann mit Ergebnissen aus 4 weiteren Untersuchungen verglichen werden.

Krawietz et al. (38) untersuchten die β -Adrenozeptorendichte an Lymphozyten mit 125-Jodocyanopindolol als Radioligand bei 7 gesunden Probanden (5 Männern und 2 Frauen) unter Laborarbeit, und bei 7 weiteren gesunden Probanden (3 Männer und 4 Frauen) unter körperlicher Ruhe. Er bestimmte Werte zu 3 Zeitpunkten, um 08h00, 13h00 und 18h00. In der inaktiven Gruppe waren zwischen 08h00 und 13h00 keine Unterschiede, zu 18h00 war ein Abfall der Werte signifikant. In der aktiven Gruppe fand er keine Unterschiede. Die Ergebnisse der inaktiven Gruppe von Krawietz stimmen mit dem Kurvenverlauf der Männergruppe dieser Studie überein. Vergleicht man die Ergebnisse von Krawietz mit denen der Männergruppe (vgl. Abb.5), so sieht man, daß Krawietz dadurch, daß er mit 08h00 vor und mit 13h00 nach dem Maximum der Männer um 10h00 lag, den Zeitpunkt des Maximums verpasste. Daß der 08h00 Wert noch während des Aufstiegs und der 13h00 Wert bereits wieder während des Abstiegs der Rezeptorendichte gemessen wurde, erklärt, warum er keinen Unterschied zwischen 08h00 und 13h00 finden konnte. Der Abfall zum 18h00 Wert hin deckt sich mit dem Kurvenverlauf der männlichen Probanden dieser Studie (vgl. Abb.5). Körperliche Aktivität beeinflusst die Höhe der β -Adrenozeptorendichte. Sie erhöht zuerst die Rezeptorendichte innerhalb von Minuten, nach 15-30 Minuten Erholung ist sie wieder, zum Teil bis unter die Ausgangswerte, abgesunken (46). Passend dazu findet Krawietz in seiner aktiven Gruppe zu allen Zeitpunkten die gleichen, bei 08h00 und 13h00 im Vergleich zur inaktiven Gruppe deutlich niedrigeren, Werte der β -Adrenozeptorendichte. Der zweite, nächtliche Gipfel der Frauen konnte mit dem Versuchsansatz von Krawietz nicht erfaßt werden, da er in der Nacht keine Messungen vornahm.

Titinchi et al. (57) untersuchten die β -Adrenozeptorendichte an intakten Lymphozyten nur zu 2 Zeitpunkten, um 08h00 und um 18h00. Um mit der vorliegenden Arbeit übereinstimmen zu können, wäre bei Titinchi um 08h00, wie bei Krawietz (38), ein höherer Wert als um 18h00, zumindest aber kein Unterschied

zwischen 08h00 und 18h00, zu erwarten. Titinchi findet jedoch im Gegenteil um 08h00 niedrigere Werte der β -Adrenozeptordichte als um 18h00. Die Ursache dieser entgegengesetzten Ergebnisse könnte im unterschiedlichen Radioliganden liegen (125-Jodo-Hydroxybenzylpindolol), auch trennte Titinchi in seiner Auswertung Männer und Frauen nicht.

Die folgenden 2 Arbeiten wurden an Granulozyten bzw. an Herzzellmembranen durchgeführt:

Fröhler et al. (22) untersuchten 10 Probanden, 3 Frauen und 7 Männer. Er fand an Granulozyten mit 3H-Dihydroalprenolol als Radioligand einen kontinuierlichen Abfall der β_2 -Adrenozeptordichte von 08h00, über 14h00 und 20h00 bis zu 02h00. Hier besteht die Möglichkeit, daß ein Gipfel um 10h00, wie in der vorliegenden Arbeit durch das 6 Stundenraster nicht wiedergegeben wurde. Auch konnte Fröhler nur einen nicht signifikanten, kontinuierlichen Abfall der Werte feststellen, da er nicht ein zweites Mal um 08h00 gemessen hat. Zum Zeitpunkt seiner letzten Messung um 02h00 ist auch in der vorliegenden Arbeit der morgendliche Anstieg noch nicht zu beobachten.

Lemmer et al. (41) schließlich arbeiteten an Herzventrikelmembranen von Ratten mit 3H-Dihydroalprenolol. Im Herz sind β_1 - und β_2 -Adrenozeptoren im Verhältnis 88 : 12 vorhanden (7,8). Die β -Adrenozeptordichte war um 20h00 um 40% höher als um 08h00. 08h00 war für die Ratten Beginn ihrer Ruhe-, 20h00 Beginn ihrer Aktivitätsperiode, also umgekehrt wie beim Menschen. Wird diese Umkehr berücksichtigt, so passen die Ergebnisse von Lemmer zu der vorliegenden Studie (vgl. Abb. 5) mit deutlich niedrigeren Werten am Uebergang Aktivitätsperiode zur Ruheperiode (22h00-02h00) als in der frühen Aktivitätsperiode (10h00). Ein Vergleich der β -Adrenozeptordichte an Lymphozyten mit der β -Adrenozeptordichte am Herzen scheint somit möglich zu sein. Dies bestätigt Beobachtungen

von erniedrigter β -Adrenozeptordichte nach Herzinfarkt an Lymphozyten (14) wie im Herzmuskel (5).

In den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit folgt der Verlauf der Dissoziationskonstante K-d (Abb.6 und 16) dem Verlauf der β -Adrenozeptorendichte. Zum Zeitpunkt hoher Werte der Rezeptordichte ist K-d hoch, auch für K-d ist die circadiane Schwankung als signifikant zu bewerten. Dies deckt sich mit anderen Arbeiten, die auch eine positive Korrelation zwischen B-max und K-d (45,57,41) belegen, bei einigen Untersuchungen bleibt K-d aber auch unverändert (22,38).

Es stellt sich die Frage, wodurch eine circadiane Schwankung von β -Adrenozeptoren an peripheren, im Blutkreislauf befindlichen, Lymphozyten verursacht sein könnte.

Die erste Möglichkeit wäre, daß sich nicht die Zahl der Rezeptoren pro Lymphozyt sondern die Zusammensetzung der untersuchten Lymphozytensubpopulationen ändert. Diese Theorie stützt sich auf Untersuchungen, wonach B-Lymphozyten höhere β -Adrenozeptorenwerte aufweisen, als T-Lymphozyten (40). Um die circadiane Schwankung der Rezeptordichte an der Gesamtlymphozytenzahl erklären zu können, müßten zum Zeitpunkt hoher Rezeptorwerte mehr B- als T-Lymphozyten im peripheren Blut sein, also die tageszeitlichen Maxima von B- und T-Lymphozyten deutlich verschieden liegen. Tatsächlich zeigt sowohl die Anzahl der B wie auch der T Lymphozyten eine signifikante circadiane Schwankung, aber die Maxima liegen zeitlich nah zusammen. B Zellen erreichen ihre maximale Anzahl (Akrophase: 04h48 (30), 20h00 (42), 23h05 (51)) zu annähernd der selben Zeit wie T Lymphozyten (Akrophase: 01h12 (30), 01h20 (42), 22h22 (51)).

Eine weitere Möglichkeit wäre, daß Schwankungen der Adrenozeptorendichte durch Schwankungen von Hormonkonzentrationen gesteuert werden. Aus der Literatur ist bekannt, daß adrenerge Agonisten, endogene wie Adrenalin

(21,34) ebenso wie exogene (zum Beispiel Isoprenalin: 32,35,52,58) die β -Adrenozeptorendichte erniedrigen (down regulation). Dieser Effekt tritt mit einer Verzögerung von über 1 Stunde auf (58). Während nach 30 Minuten bis 1 Stunde unter Dauerinfusion von Adrenalin beziehungsweise Isoprenalin die Rezeptorendichte an Lymphozyten erhöht ist, sinkt sie danach langsam ab und ist nach 4-6 Stunden unter den Ausgangswerten. Agonisten erniedrigen also die β -Adrenozeptorendichte mit einer Verzögerung von einigen Stunden. Dazu passend erreicht die Adrenalinkonzentration im Plasma ihr Maximum um 16h00 (3,19), und 6 Stunden später erreicht die β -Adrenozeptorendichte an Lymphozyten ihr Minimum (22h00). Glukokortikoide wiederum erhöhen eine durch Agonisten herabregulierte Rezeptordichte (11,34). Oral verabreichtes Prednison beschleunigt den Wiederanstieg durch Terbutalin herab-regulierter β -Adrenozeptordichten (11). Wie schnell dieser Effekt bei i.v. Gabe auftritt ist aber noch nicht bekannt. Durch das relativ grobe 4 Stundenraaster kann auch die vorliegende Arbeit nur aussagen, daß dieser Effekt in einem Zeitraum von bis zu einigen Stunden auftritt. Diese Aussage stützt sich auf die positive Korrelation der Cortisolkonzentration und der β -Adrenozeptorendichte sowie auf das gemeinsame Maximum um 10h00 (vgl. Abbildung 25). Die Ergebnisse lassen also eine Steuerung der β -Adrenozeptorendichte mit einem negativen Einfluß von Adrenalin und einem positiven von Cortisol vermuten.

Ueber einen saisonalen Unterschied der β -Adrenozeptorendichte zwischen Sommer (April-Juli) und Winter (Dezember) sind bisher keine Ergebnisse veröffentlicht worden, wie überhaupt saisonale Einflüsse ein noch wenig untersuchtes Gebiet sind. Nach den hier vorhandenen Ergebnissen sind im Sommer die 24h-Mittelwerte der Rezeptordichte höher als im Winter. Zwar könnte, anders als bei der circadianen Schwankung, die Ursache in einer veränderten Zusammensetzung der Lymphozytenpopulation

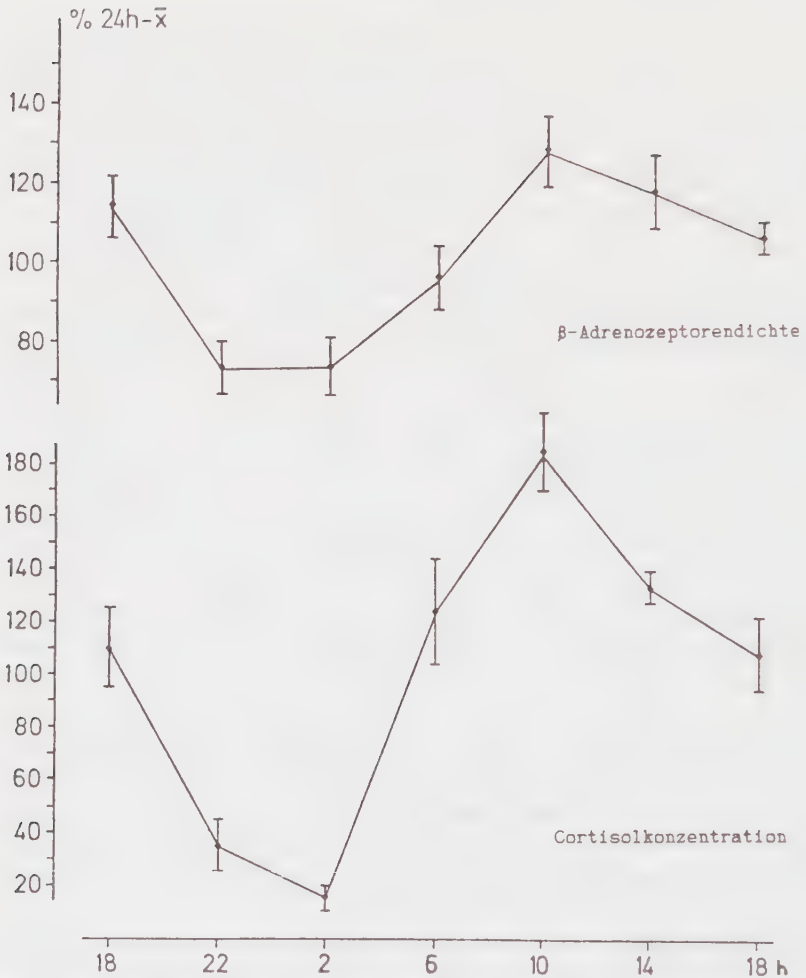


Abb. 25: Vergleich der circadianen Variation der β -Adrenozeptorendichte mit der circadianen Variation der Cortisolkonzentration bei Männern

Die obere Kurve zeigt die circadiane Variation der β -Adrenozeptorendichte an intakten Lymphozyten (24 Stunden Mittelwert=100%=892Moleküle/Zelle), die untere Kurve die circadiane Variation der Cortisolkonzentration (24h- $\bar{x}$ =100%=11.1 μ g/dl). Die β -Adrenozeptorendichte und die Cortisolkonzentration erreichen um 10h00 ein Minimum und zwischen 22h00 und 02h00, bzw. um 02h00 ein Minimum. Deutlich zeigt sich ein paralleler Verlauf der circadianen Variationen.

liegen. Abo et al. (1) fanden über zwei Jahre einen signifikant größeren Anteil von B-Lymphozyten an der Gesamtlymphozytenzahl im Sommer als im Winter. Die circannuale Variation folgte dem Verlauf der Außentemperaturen. Davon ausgehend, daß B-Lymphozyten höhere β -Adrenozeptorendichten zeigen als T-Lymphozyten (40), ist eine veränderte Zusammensetzung der Zellpopulation als Ursache saisonaler Unterschiede durchaus in Betracht zu ziehen. Es ließe sich damit jedoch nur der Unterschied der 24h-Mittelwerte erklären, nicht aber die gleichzeitig niedrigere 24h-Amplitude im Sommer. Es müssen hier zusätzliche Mechanismen eine Rolle spielen.

Die gefundene circadiane Schwankung der Expression von β -Adrenozeptoren bedeutet, daß frühere Arbeiten kritisch hinterfragt werden sollten. Rezeptorstudien sollten circadiane, saisonale und auch geschlechtsspezifische Einflüsse berücksichtigen.

4.2. β_2 -Adrenozeptoren an Lymphozyten als Indikator für die periphere sympathische Aktivität bei der Kreislaufregulation

Für den Fall, daß eine Kreislaufregulation durch das sympathische Nervensystem sich in einer Veränderung von präsynaptischen und vasalen Adrenozeptorzahlen ausdrückt, wäre eine Korrelation der β -Adrenozeptorendichte mit den Kreislaufparametern Blutdruck und Puls zu erwarten. Solch eine Korrelation könnte positiv sein bei Ueberwiegen der Wirkung präsynaptischer, den Blutdruck und die Pulsfrequenz erhöhender, β_2 -Adrenozeptoren; sie wäre negativ bei Ueberwiegen der Wirkung vasaler β_2 -Adrenozeptoren auf glatten

Gefäßmuskelzellen. Die Korrelation könnte aber auch nur für den Puls positiv und bei einander aufhebender Wirkung für den Blutdruck gar nicht vorhanden sein (62, 49, vgl. Einleitung). Der Nachweis einer Korrelation von Kreislaufparametern zur β_2 -Rezeptordichte an Lymphozyten würde sowohl die Bedeutung der präsynaptischer und vasaler β_2 -Adrenozeptordichten für die Kreislaufregulation wahrscheinlich machen, als auch β_2 -Adrenozeptoren am Lymphozyten als Indikator für die periphere sympathische Aktivität bei der Kreislaufregulation bestätigen.

Bei den hier dargestellten Ergebnissen ist eine solche Korrelation nur bei Verwendung der durch die Cosinor Analyse berechneten Rhythmusparameter möglich. Abbildung 26 zeigt den Vergleich der circadianen Variation der β -Adrenozeptordichte mit der des mittleren Blutdrucks bei Männern. Hier ist eine Phasenverzögerung des Blutdrucks von ca. 4 Stunden zu sehen, die sich auch in den Ergebnissen der Cosinor Analyse der Blutdruck- und Pulsmessungen widerspiegelt. Die Akrophasen von Blutdruck [systolischer (17h08), diastolischer (16h48), mittlerer Blutdruck (17h24) und Puls (16h04)] liegen ca. 4 Stunden später als die Akrophase der β -Adrenozeptordichte an Lymphozyten (12h32)1. Unter Berücksichtigung dieser Phasenverzögerung zeigt sich eine positive Korrelation zu systolischem, diastolischem, mittlerem Blutdruck und Puls. Ebenfalls ist eine negative Korrelation der circadianen Amplitude der Rezeptordichte mit den circadianen Amplituden des diastolischen und des mittleren Blutdrucks nachweisbar.

Sowohl der Einfluß der präsynaptischen wie auch der vasalen β_2 -Adrenozeptoren kann hierin gesehen werden:

Stimulation präsynaptischer β_2 -Adrenozeptoren erhöht den Blutdruck durch eine verstärkte Noradrenalinausschüttung. Noradrenalin wirkt auf α -Adrenozeptoren an Blutgefäßen deren Stimulation eine Vasokonstriktion zur Folge hat, und auf β_1 -Adrenozeptoren im Herz deren Stimulation die Herzfunktion verstärkt (46, 56).

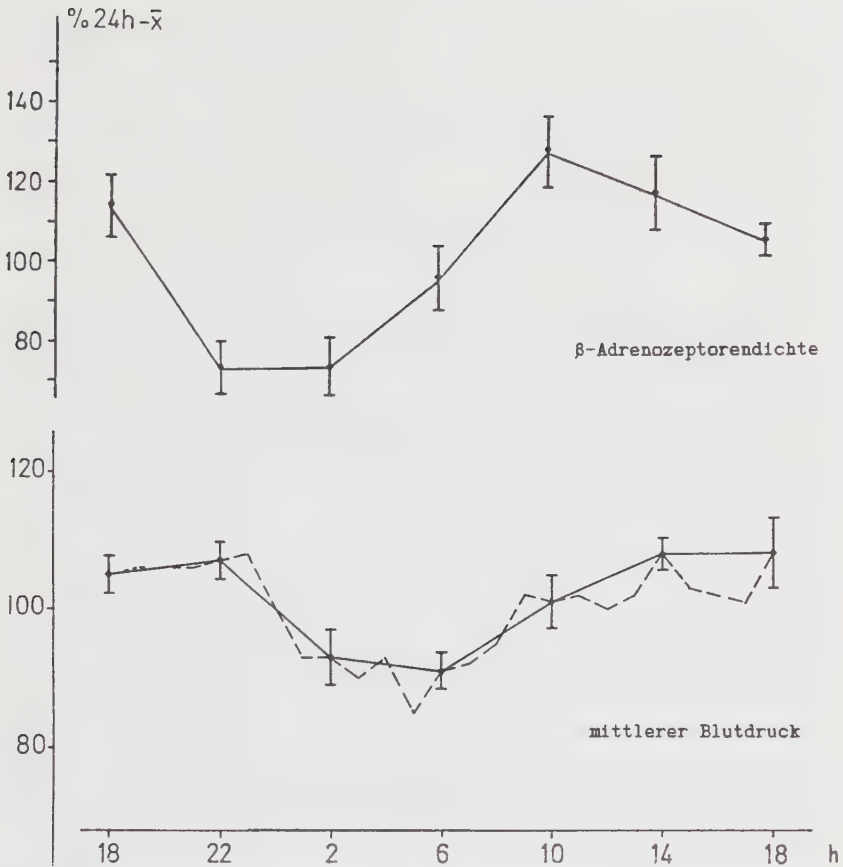


Abb. 26: Vergleich der circadianen Variation der β -Adrenozeptorendichte mit der des mittleren Blutdrucks bei Männern

Die obere Kurve zeigt den circadianen Verlauf der β -Adrenozeptorendichte (24h-Stunden Mittelwert = 100% = 892 Moleküle/Zelle), die untere Kurve den des mittleren Blutdrucks (24h- $\bar{x}$ =100%=87.7mmHg). Die Werte sind als $\pm$ SE aufgetragen. Die gestrichelte Kurve des mittleren Blutdrucks zeigt die stündlichen Messungen, hier ist aus Gründen der Uebersichtlichkeit keine Streuung eingetragen. Die β -Adrenozeptorendichte erreicht 4 Stunden früher als der Blutdruck ihr nächtliches Minimum. Am Vormittag ist sie bereits um 10h00, also wiederum 4 Stunden vor dem Blutdruck, auf maximale Werte angestiegen.

Stimulation der vasalen β_2 -Adrenozeptoren wirkt dagegen dilatierend auf die glatte Gefäßmuskulatur. Der periphere Widerstand nimmt ab und der Blutdruck sinkt.

Andere Arbeitsgruppen, die keine tageszeitlichen Einflüsse untersuchten, fanden nur eine positive Korrelation zwischen Blutdruck und β -Adrenozeptordichte an Lymphozyten (11,12, 14,15,21,42,47,48,49,53).

Ueber die Ursachen der Akrophasenverschiebung von 4 Stunden können nur Vermutungen angestellt werden. Denkbar wäre eine Verzögerung der erhöhten Noradrenalinfreisetzung an peripheren Nervenendigungen. Ebenso sind Phasenunterschiede zwischen β -Adrenozeptoren an im Blutkreislauf befindlichen Lymphozyten und β -Adrenozeptoren an festen Geweben zu diskutieren. Solche Unterschiede würden die Modellfunktion lymphozytärer Rezeptoren in Frage stellen. Auch ist ein Einfluß zusätzlicher Mechanismen, zB der parasympathischen Steuerung, auf den Blutdruck zu berücksichtigen.

Zusammenfassend spiegelt nach den vorliegenden Ergebnissen eine Veränderung der β_2 -Adrenozeptordichte an Lymphozyten Veränderungen der sympathischen Aktivität bei der Regulation des Blutdrucks wider. Weiter zu klären bleibt die Frage welche Mechanismen zu einer Akrophasendifferenz zwischen Blutdruck und β -Adrenozeptordichte an Lymphozyten führen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Bei 11 Versuchspersonen, 7 Männern und 4 Frauen, wurde über 24 Stunden um 18h00, 22h00, 02h00, 06h00, 10h00, 14h00, und nochmals um 18h00, Blut aus einer Kubitalvene entnommen. Nach Isolieren von intakten Lymphozyten wurde die lymphozytäre β -Adrenozeptorendichte mit einem Radio-Rezeptor-Assay bestimmt. Als Radioligand diente $^{-125}\text{Jodo}$ -cyanopindolol (J-CYP). Aus denselben Proben wurde die Plasmakonzentration von Cortisol, die Gesamtleukozyten-, Lymphozyten- und die Granulozytenzahl bestimmt. Mit einem automatischen Meßgerät wurde stündlich Blutdruck und Puls gemessen. 6 der Versuche (3 Männern und 3 Frauen), fanden im Sommer zwischen April und Juli, 5 der Versuche (4 Männer, 1 Frau) im Dezember statt.

Bei den Männern fand sich eine signifikante circadiane Schwankung der β -Adrenozeptorendichte und der Dissoziationskonstante K_d ($p < 0.01$). Die individuellen circadianen Messungen zeigten maximale Werte zwischen 06h00 und 14h00, und ein Minimum zwischen 22h00 und 02h00. Die β -Adrenozeptordichte schwankte im Mittel um $\pm 30\%$ eines 24 Stunden Mittelwertes von 892 ± 98 Molekülen/Zelle ($\bar{x} \pm \text{SE}$). Auch die anderen gemessenen Parameter zeigten signifikante circadiane Schwankungen. Die circadiane Variation der Cortisolkonzentration war positiv, die circadiane Variation der Lymphozytenzahlen war negativ mit der circadianen Variation der β -Adrenozeptorendichte korreliert. Blutdruck und Puls erreichten das circadiane Maximum 4 Stunden nach der Rezeptorendichte. Unter Berücksichtigung dieser Phasenverzögerung waren Blutdruck und Puls positiv mit der β -Adrenozeptorendichte korreliert. Zwischen der circadianen Amplitude des diastolischen und des mittleren Blutdrucks und der circadianen Amplitude der β -Adrenozeptorendichte bestand eine negative Korrelation.

Auch Frauen zeigten eine circadiane Variation der β -Adrenozeptorendichte und der Dissoziationskonstante K-d. Es fanden sich jedoch zwei Maxima, in der Nacht zwischen 22h00 und 06h00 und am Vormittag zwischen 10h00 und 14h00. Die Werte der Rezeptordichte schwankten zwar individuell betrachtet um $\pm 30\%$ um den 24-Stunden Mittelwert von 911 ± 146 Moleküle/Zelle ($\bar{x} \pm SE$). Für die Gruppe waren diese circadianen Unterschiede aber nicht signifikant, da große interindividuelle Unterschiede in der zeitlichen Lage des nächtlichen Maximums bestanden. Die circadiane Variation korrelierte nicht mit den circadianen Variationen der übrigen Parameter.

Bei Männern war der 24h Mittelwert der β -Adrenozeptorendichte im Sommer (1135 ± 10 Bindungsstellen/Zelle, $\bar{x} \pm SE$) signifikant ($p < 0.01$) höher als im Winter (712 ± 90 Bindungsstellen/Zelle, $\bar{x} \pm SE$), während die circadiane Amplitude im Sommer bei unveränderter Akrophase signifikant ($p < 0.05$) kleiner war als im Winter.

6. LITERATUR

1. ABO T; KUNAGAI K (1978)
Studies of Surface Immunoglobins on Human B Lymphocytes
III. Physiological Variations of SIg+ Cells in Peripheral Blood
Clin Exp Immunol 33, 441-452
2. ARNER B; BERTLER A; KARLEFORS T; WESTLING H (1970)
Circulatory Effects of Orciprenaline, Adrenaline and a new Sympathomimetic
 β -Receptor-Stimulating Agent, Terbutaline, in Normal Human Subjects
Acta Med Scand Suppl. 512, 25-32
3. BARNES PJ; FITZGERALD GA; BROWN M; DOLLERY C (1980)
Nocturnal Asthma and Changes in Circulating Epinephrine, Histamine and
Cortisol
New England J Med. 303, 263-267
4. BOYUM A (1968)
Isolation of Leucocytes from Human Blood
Scand J Clin Invest 21, Suppl 97
5. BRISTOW MR; GINSBURG R; MINOBE W; GUBICCIOTTI RS; SAGEMAN WS; LURIE K;
BILLINGHAM ME; HARRISON DC; STINSON EB (1982)
Decreased Catecholamine Sensitivity and β -Adrenergic-Receptor Density in
Failing Human Hearts
N.Engl. J. Med. 307, 205-211
6. BRODDE OE; ENGEL G; HOYER D; BOCK KD; WEBER F (1981)
The β -Adrenergic Receptor in Human Lymphocytes; Subclassification by the
Use of a new Radioligand $\pm$ 125-Iodocyanopindolol
Life Sci 29, 2189-2198
7. BRODDE OE; KARAD K; ZERKOWSKI HR; ROHM W; REIDEMEISTER JC (1982)
Demonstration of β_1 - and β_2 Adrenoceptors in Human Heart by 125-
Iodocyanopindolol (I-Cyp) Binding
Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharm 321, R 61
8. BRODDE OE; BOCK KD; ROHM W; ZERKOWSKI NR; REIDEMEISTER JC (1983)
Nachweis und quantitative Bestimmung von β_1 - und β_2 - Adrenoceptoren im
Herzen und in der Lunge des Menschen
89. Verb Dtsch Ges Inn Med, 613-616
9. BRODDE OE; PRYWARRA A; ANLAUF M; DAUL A; BOCK KD (1983)
Increased number of β_2 -Adrenoceptors in Circulating Lymphocytes of
Patients with essential Hypertension
J Hypertension 1 (Suppl 2), 263-266
10. BRODDE OE; PRYWARRA A; DAUL A; ANLAUF M; BOCK KD (1984)
Correlation between Lymphocyte β_2 -Adrenoceptor density and Mean
Arterial Blood Pressure: Elevated β -Adrenoceptors in Essential
Hypertension
J Cardiovasc Pharmacol 6, 678-682

11. BRODDE OE; BRINKMANN M; SCHEMUTH R; O'HARA N; DAUL A (1985)
Terbutaline-induced Desensitization of human Lymphocyte β_2 -Adrenoceptors - Accelerated Restoration of β -Adrenoceptor Responsiveness by Prednisone and Ketotifen
J Clin Invest 76, 1096-1101
12. BRODDE OE; DAUL AE; O'HARA N; KHALIFA AM (1985)
Properties of α - and β -Adrenoceptors in Circulating Blood Cells of Patients with Essential Hypertension
J Cardiovasc Pharmacol 7 (Suppl 6), 162-167
13. BRUSCHI G; ORLANDINI G; PAVARANI C; SPAGGIARI M; TACINELLI L; CARATORTA A (1984)
Lymphocytic Beta-Adrenoceptor Abnormality in Primary Hypertension
IRCS Med Sci 12, 461-462
14. COLUCCI WS; ALEXANDER RW; WILLIAMS GH; RUDE RE; HOLMAN BL; KONSTAM MA; WYNNE J; MUDGE GH; BRAUNWALD E (1981)
Decreased Lymphocyte Beta-Adrenergic-Receptor Density in Patients with Heart Failure and Tolerance to the Beta-Adrenergic Agonist Pirbuterol
N. Engl. J. Med. 305, 185-190
15. DAVIES AO; LEFKOWITZ RJ (1980)
Corticosteroid Induced Differential Regulation of β -Adrenergic Receptors in Circulating Human Polymorphonuclear Leucocytes and Mononuclear Leucocytes
J Clin Endocrin Metab 51, 599-605
16. DE CHAMPLAIN J (1978)
The Contribution of the Sympathetic Nervous System to Arterial Hypertension
Canad J Physiol Pharmacol 56, 341-353
17. DRAYER JM; WEBER MA; DE YOUNG JL; WYLE FA (1982)
Circadian Bloodpressure Patterns in Ambulatory Hypertensive Patients
Americ J Med 73, 493-499
18. DOYLE V; O'MALLEY K; KELLY JG (1982)
Human Lymphocyte β -Adrenoceptor Density in Relation to Age and Hypertension
J Cardiovasc Pharmacol 4, 738-740
19. FITZGERALD GA; BARNES P; BROWN M et al. (1980)
The Circadian Variability of Circulating Adrenaline and Bronchomotor Reactivity in Asthma
in: Recent Advances in the Chronobiology of Allergy and Immunology (eds MH Smolensky, A Reinberg, JP Mc Govern) Pergamon Press Oxford/New York pp 89-94
20. FITZGERALD DJ; DOYLE V; O'BRIEN ET; KELLY JG; O'MALLEY K (1983)
Beta Adrenoceptor Density and Responsiveness in Borderline Hypertension
J Hypertens 1, (Suppl 2), 260-262
21. FRASER J; MADEAU J; ROBERTSON D; WOOD AJJ (1981)
Regulation of Human Leucocyte Receptors by Endogenous Catecholamines
J Clin Invest 67, 1777-1784

22. FRÖHLER M; SAITO Y; ACKENWHEIL M; BONDY B; FEISTENAUER E; HOFSCHESTER E;
VAKIS A; WELTER D (1985)
Catecholaminergic Binding Sites on Blood Cells of Healthy Volunteers with
Special Respect to Circadian Rhythms
Pharmacopsychiat. 1, 147-148
23. GANTEN D; LANG RE; RASCHER V; MANN JFE; UNGER TH (1981)
Pathophysiologie der essentiellen Hypertonie
Munch Med Wschr 123, 1780-1784
24. GOLDSTEIN DS (1983)
Plasma Catecholamines and Essential Hypertension; An Analytical Review
Hypertension 5, 89-99
25. HADDEN JW; HADDEN EM; MIDDLETON E (1970)
Lymphocyte Blast Transformation
Cellular Immunology 1, 583-595
26. HALBERG F; TONG YL; JOHNSON EA (1967)
Circadian System Phase - An Aspect of Temporal Morphology ; Procedures
and Illustrative Examples
in : The Cellular Aspects of Biorhythms (ed H v Mayersbach) Springer Verlag
Berlin/Heidelberg/New York pp 20-48
27. HALBERG F; JOHNSON EA; NELSON W; RUNGE W; SOTHERN RB (1972)
Autorhythmometry - Procedures for Physiologic Selfmeasurements and their
Analysis
Physiol Teacher 1, 1-11
28. HALBERG F; SCHEVING LE; LUCAS E; CORNELISSEN G; SOTHERN RB; HALBERG E;
HALBERG J; HALBERG FRANCINE; CARTER J; STRAUB KD; REDMOND DP (1984)
Chronobiology of Human Blood Pressure in the Light of Static (Room-
Restricted) Automatic Monitoring
Chronobiologia 11, 217-248
29. HALBERG J; HALBERG F; LEACH CN (1984)
Variability of Human Blood Pressure with Reference mostly to the Non-
Chronobiologic Literature
Chronobiologia 11, 205-216
30. HAUS E; LAKATUA DJ; SACKETT-LUNDEEN LL; SWAYER J (1984)
Chronobiology in Laboratory Medicine
in: Clinical Aspects of Chronobiology; ed. WJ Rietveld; Meducation
Service Hoechst; pp 13-83
31. HILL L; LOWD MB (1898)
On Rest, Sleep, and Work and the Concomitant Changes in the Circulation of
the Blood
Lancet, 282-285
32. HOMBURGER V; LUCAS M; CANTAU B; BARABE J; PENIT J; BOCKAERT J (1980)
Further Evidence that Desensitization of β -Adrenergic Sensitive Adenylate
Cyclasis Proceeds in Two Steps
J Biol Chem 255, 10436-10444

33. HOWELL WH (1897)
A Contribution to the Physiology of Sleep, based upon Plethysmographic Experiments
J exp Med 2, 313-346
34. INSEL PA (1985)
Adrenergic Receptors on Human Blood Cells
in: Pharmacology of Adrenoceptors, eds.: Szabadi E, Bradshaw CM, Nahorski SR, VCH Verlag 1985, pp 215-224
35. JOHNSON GL; WOLFE B; HARDEN K; MOLINOFF PB; PERKINS JP (1978)
Role of β -Adrenergic Receptors in Catecholamine-induced Desensitization of Adenylate Cyclase in Human Astrocytoma Cells
J Biol Chem 253, 1472-1480
36. KAFKA MS; LAKE CR; GULLNER HG (1979)
Adrenergic Receptor Function is Different in Male and Female Patients with Essential Hypertension
Clin Exp Hypertens 1, 613-627
37. KRALL JF; CONNELLY M; TUCK ML (1980)
Acute Regulation of β -Adrenergic Catecholamine Sensitivity in Human Lymphocytes
J Pharmacol Exp Ther 214, 554-560
38. KRAWIETZ W; KLEIN EM; UNTERBERG CH; ACKENHEIL M (1985)
Physical Activity Decreases the Number of β -Adrenergic Receptors on Human Lymphocytes
Klin Wschr 63, 73-78
39. LANDMANN R; BURGNER E; BÜHLER FR (1983)
Human Lymphocytes as a model for Beta-Adrenergic Receptors in Clinical Investigation
J Receptor Res 3, 71-88
40. LANDMANN R; BURGISSER E; WESP M; BÜHLER FR (1984)
Beta-Adrenergic Receptors are Different in Subpopulations of Human Circulating Lymphocytes
J Receptor Res 4, 37-50
41. LEMMER B; LANG PH (1984)
Evidence for a Circadian -Phase-Dependency in $3H$ -DHA Binding and Cyclic AMP Content in Heart Ventricles of L-D-Synchronized Rats
Pol J Pharmacol Pharm 36, 275-280
42. LEVI FA; CANOW C; BLUM JP; MECHKOURI M; REINBERG A; MATHE G (1985)
Circadian and/or Circahemian Rhythms in Nine Lymphocyte-Related Variables from Peripheral Blood of Healthy Subjects
J Immunology 134, No.1, 217-222
43. MENZEL W (1961)
über labile und paroxysmale Hypertonie
Med Welt 12, 560-565

44. MIDDEKE M (1983)
Adrenerge Rezeptoren
Munch Med Wschr 125, 1041-1044
45. MIDDEKE M; REMIEN J; BLOCK LH; KIRZINGER S; LANDROCK A; HOLZGREVE H (1983)
Beta-2-Adrenoceptor Density on Membranes and on Intact Mononuclear Cells
in Essential Hypertension
Res Exp Med 183, 227-232
46. MIDDEKE M; REMIEN J; HOLZGREVE H (1984)
The Influence of Sex, Age, Blood Pressure and Physical Stress on β -2-
Adrenoceptor Density of Mononuclear Cells
J Hypertension 2, 261-264
47. MILLAR-CRAIG MW; BISHOP CW; RAFTERY EB (1978)
Circadian Variation of Blood-Pressure
Lancet, 795-797
48. MULLEN PE; LIGHTMAN S; LINSSELL C (1985)
Rhythms of Plasma Noradrenaline in Man
Psychoneuroendocrinology 6, 213
49. O'MALLEY KO; O'BRIEN E; FITZGERALD D; KELLY J (1985)
Adrenoceptors and Hypertension
in: Pharmacology of Adrenoceptors, eds.: Szabadi E, Bradshaw CM,
Nahorski SR, VCH Verlag 1985, pp 197-204
50. PORZIG H (1982)
Are there Differences in the β -Receptor-Adenylate-Cyclase System of Frag-
mented Membranes and Living Cells
in: More About Receptors; Current Reviews in Biomedicine Vol 2, Elsevier
Biomedicine Press, pp 25-31
51. RITCHIE AWS; OSWALD I; SPEDDING MICKLEM H; BOYD JE; ELTON RA; JAZWINSKA E
JAMES K (1983)
Circadian Variation of Lymphocyte Subpopulations: A study with Monoclonal
Antibodies
Brit Med J 286, 1773-1775
52. SAWO Y; FORD L; BEGLEY M; WATT G; TOWNLEY R; TSAI H; BEVTRA A (1980)
Effect of in Vivo Antiasthma Drugs on Human Leucocyte β -Adrenergic
Receptors
Clin Res 28, 431 A
53. SCATCHARD G (1949)
The Attraction of Proteins for Small Molecules and Ions
Ann NY Acad Sci 51, 660-672
54. SCHMIDT TH; SCHAFER M; MARTH H (1974)
Vergleich tagesperiodischer Schwankungen blutig gemessener Blutdruckwerte
bei Normotonikern und Hypertonikern
Verh Dtsch Ges Inn Med 80, 298-300

55. SOMAN VR; SHAMON H; SHERWIN RS (1980)
Effects of Physiological Infusion of Epinephrine in Normal Humans:
Relationship between the Metabolic Response and β -Adrenergic Binding
J Clin Endocrin Metabol 50, 294-297
56. STARKE K; MAJEWSKI H; EWSINGER H; SZABO B; HEDLER L (1986)
In Vivo Operation of Prejunctional Adrenoceptors in the Peripheral
Sympathetic Nervous System
in: New Aspects of the Role of Adrenoceptors in the Cardiovascular System,
eds.: Grobecker H, Philippu A, Starke K; Springer Verlag Berlin, Heidelberg
New York 1986; pp 43-56
57. TITINCHI S; AL SHAMMA M; PATEL KR; KERR JW; CLARK B (1984)
Circadian Variation in Number and Affinity of β -2-Adrenoceptors in Lympho-
cytes of Asthmatic Patients
Clin Sci 66, 323-328
58. TOHMEH JF; CRYER PE (1980)
Biphasic Adrenergic Modulation of β -Adrenergic Receptors in Man
J Clin Invest 65, 836- 840
59. WEBER MA; DRAYER JIM (1982)
The Sympathetic Nervous System in Primary Hypertension
Mineral, Electrolyte Metab 7, 57-66
60. WEBER MA; DRAYER JIM; NAKAMURA DK; WYLE FA (1984)
The Circadian Blood Pressure Patterns in Ambulatory Normal Subjects
Am J Cardiol 54, 115-119
61. WILLIAMS GH; CAIN JP; DLUHY RG; UNDERWOOD RH (1972)
Studies of the Control of Plasma Aldosterone Concentration in Normal
Man
J Clin Invest 51, 1731-1742
62. WILLIAMS LT; SNYDERMAN R; LEFKOWITZ RJ (1976)
Identification of β -Adrenergic Receptors in Human Lymphocytes by (-) 3H
Alprenolol Binding
J Clin Invest 57, 149-155
63. ZADEK I (1881)
Die Messung des Blutdrucks am Menschen mittelst des Basch'schen Apparates
Z Klin Med 2, 509-551

7. ANHANG:

Tabellarische Zusammenfassung der statistischen Ergebnisse:

Für die Messungen an männlichen Versuchspersonen sind die Ergebnisse der Varianzanalyse in Tabelle 4, der Populationscosinor Analyse in Tabelle 6 und der Korrelationsberechnungen in Tabelle 8 zusammengefasst.

Für die Messungen an weiblichen Versuchspersonen sind die Ergebnisse der Varianzanalyse in Tabelle 5, der Populationscosinor Analyse in Tabelle 7 und der Korrelationsberechnungen in Tabelle 9 zusammengefasst.

Die Tabellen 10-13 enthalten die Originaldaten der β -Adrenorezeptorendichte und der Dissoziationskonstante K-d.

Tabelle 4: Zusammenfassung der Ergebnisse der Varianzanalyse (Anova)
- Männer

- gerechnet mit Einzelwerten in % des 24h Mittelwerts-
- Signifikanzgrenze $p < 0.05$

B-max	$p < 0.001$
K-d	$p < 0.05$
Cortisol	$p < 0.001$
Leukozyten	$p < 0.001$
Lymphozyten	$p < 0.01$
Granulozyten	$p < 0.05$
Systolischer BD	$p < 0.001$
Diastolischer BD	$p < 0.001$
Mittlerer BD	$p < 0.001$
Puls	$p < 0.001$

Tabelle 5: Zusammenfassung der Ergebnisse der Varianzanalyse (Anova)
- Frauen

- gerechnet mit Einzelwerten in % des 24h Mittelwerts-
- Signifikanzgrenze $p < 0.05$

B-max	nicht signifikant
K-d	nicht signifikant
Cortisol	$p < 0.001$
Leukozyten	$p < 0.01$
Lymphozyten	$p < 0.05$
Granulozyten	nicht signifikant
Systolischer BD	$p < 0.01$
Diastolischer BD	$p < 0.001$
Mittlerer BD	$p < 0.001$
Puls	nicht signifikant

**Tabelle 6: Zusammenfassung der Ergebnisse des Populationscosinor
- Männer**

	Einheit	p	PR	Mesor	Amplitude	Acrophase ° / MEZ
B-max	Sites/Cell					
	-Sommer	0.2872	60.0	1131	166	-188 / 12h32
	-Winter	0.0940	76.0	706	293	-189 / 12h36
	% 24h x	0.0163	69.3	100%	29.6%	-188 / 12h32
K-d	mol / l 10 ⁻¹²	0.0026	36.0	2.82	0.77	-185 / 12h20
Cortisol	µg / dl	0.0007	72.0	11.0	8.6	-176 / 11h44
Leukozyten	Zellen / µl	0.0053	73.0	6106	887	-348 / 23h12
Lymphozyt.	Zellen / µl	0.0697	61.3	2684	433	- 11 / 00h44
Granulozyt.	Zellen / µl	0.2111	51.3	3059	283	-335 / 22h20
Systol. BD	mm Hg	0.0296	38.0	112.7	7.0	-257 / 17h08
Diastol. BD	mm Hg	0.0014	47.3	71.0	8.0	-252 / 16h48
Mittl. BD	mm Hg	0.0091	36.7	87.7	6.5	-261 / 17h24
Puls	1 / min	0.0058	38.6	71.7	8.2	-241 / 16h04

Periodendauer 24 Stunden

Signifikanzgrenze $p < 0.05$

° = Grad, 24h00 = 0° / -360° ; MEZ = Mitteleuropäische Ortszeit

**Tabelle 7: Zusammenfassung der Ergebnisse des Populationscosinor
- Frauen**

	Einheit	p	PR	Mesor	Amplitude	Acrophase ° / MEZ
B-max	sites/cell					
	-Sommer	0.0494	9.0	1000	61.3	-226 / 15h04
	-Winter	0.7410	14.0	634	99.0	-145 / 09h40
	% 24h x	0.1532	10.3	100%	5.65%	-197 / 13h08
K-d	mol / l 10 ⁻¹²	0.0656	48.3	3.37	0.58	-261 / 17h24
Cortisol	µg / dl	0.1358	70.8	15.8	9.5	-166 / 11h04
Leukozyten	Zellen / µl	0.3862	43.5	6948	640	- 11 / 00h44
Lymphozyt.	Zellen / µl	0.3209	37.8	2906	490	-357 / 23h48
Granulozyt.	Zellen / µl	0.0335	40.5	3656	212	- 69 / 04h36
Systol. BD	mm Hg	0.1053	33.0	104.8	5.0	-245 / 16h20
Diastol. BD	mm Hg	0.0552	38.0	63.8	5.6	-243 / 16h12
Mittl. BD	mm Hg	0.0613	38.8	81.5	6.1	-240 / 16h00
Puls	1 / min	0.0965	13.3	73.0	4.9	-227 / 15h08

Periodendauer 24 Stunden

Signifikanzgrenze $p < 0.05$

° = Grad, 24h00 = 0° / -360° ; MEZ = Mitteleuropäische Ortszeit

Tabelle 9: Korrelationen der Ergebnisse der Frauen

Berechnung des Korrelationskoeffizienten r mit der linearen Regression

Markierung :	*	**	***
Signifikanzgrenzen:	$p < 0.05$	$p < 0.01$	$p < 0.001$
$n = 4$	$r > 0.950$	0.990	0.999

Korrelation der 24 Stunden Mittelwerte

	Cortisol	Leuko.	Lymph.	Granulo.	SystBD	DiastBD	MBD	Puls
B-max	-0.886	-0.417	0.284	-0.293	0.471	0.235	0.352	0.610

Korrelation des circadianen Verlaufs

	Cortisol	Leuko.	Lymph.	Granulo.	SystBD	DiastBD	MBD	Puls
B-max	0.447	-0.209	-0.245	-0.046	0.823	0.527	0.671	0.640

Korrelation über 24 Stunden unter Berücksichtigung der Phasenverschiebung von 4 Stunden zwischen B-max und den Kreislaufparametern

		SystBD	DiastBD	MBD	Puls
B-max	(- 4 Stunden)	0.044	0.370	0.082	0.144

Korrelation der circadianen Amplituden in % des Mesor (Einzelcosinor)

Da bei den Frauen keine mit Cosinor als signifikant bewertete circadiane Variation vorliegt, ist eine Berechnung nicht möglich.

Tabelle 10: β -Adrenozeptorendichte an Lymphozyten (B-max) bei Männern [Moleküle/Zelle]

Die Versuchspersonen 1, 2 und 3 wurden im Sommer (April bis Mai), die Versuchspersonen 7, 8, 10 und 11 im Winter (Dezember) untersucht. Der Student t-Test zeigt im Sommer signifikant höhere 24h-Mittelwerte als im Winter ($p < 0.01$). Die Ergebnisse sind in Moleküle/Zelle angegeben.

Proband	1	2	3	7	8	10	11
Uhrzeit							
18	-	-	1176	895	905	610	779
22	1128	982	929	486	429	278	522
02	902	1128	808	468	364	339	592
06	1234	1256	979	630	932	373	647
10	1147	1271	1291	1039	1023	679	1265
14	1366	953	1550	815	848	511	1318
18	1137	1212	1100	880	801	424	1071
24h x	1152	1134	1119	745	751	459	885
± SE	63	58	92	81	95	54	122

_____Sommerversuche_____

_____Winterversuche_____

Tabelle 11: β -Adrenozeptorendichte an Lymphozyten (B-max) bei Frauen
[Moleküle/Zelle]

Die Versuchspersonen 4, 5 und 6 wurden im Sommer (Juni bis Juli), die Versuchsperson 9 im Winter (Dezember) untersucht.

Die Ergebnisse sind in Moleküle/Zelle angegeben.

Proband	4	5	6	9
Uhrzeit				
18	905	746	1457	468
22	896	1020	858	554
02	1157	620	1366	625
06	632	675	1570	513
10	738	950	939	1003
14	1190	711	1806	456
18	855	861	1213	759
24h x	910	798	1311	625
± SE	76	55	125	73

_____Sommerversuche_____

_____Winterversuch_____

Tabelle 12: Dissoziationskonstante K_d für (-) 125-J-CYP
bei Männern [pmol/l]

Die Versuchspersonen 1, 2 und 3 wurden im Sommer (April bis Mai), die Versuchspersonen 7, 8, 10 und 11 im Winter (Dezember) untersucht. Der Student t-Test zeigt im Sommer signifikant höhere 24h-Mittelwerte als im Winter ($p < 0.05$). Die Ergebnisse sind in pmol/l angegeben.

Proband	1	2	3	7	8	10	11
Uhrzeit							
18	-	-	3.06	2.11	2.17	3.75	1.77
22	4.14	1.49	2.18	1.25	2.22	1.36	1.80
02	2.91	2.71	1.66	0.96	1.45	2.59	2.77
06	6.62	3.67	1.94	1.17	3.72	1.44	1.66
10	4.19	2.82	2.99	3.22	2.83	4.76	3.00
14	4.17	2.49	7.03	2.71	1.84	2.73	3.07
18	4.51	3.23	3.38	3.29	3.69	1.85	2.78
24h x	4.42	2.74	3.18	2.10	2.56	2.64	2.41
± SE	0.45	0.27	0.67	0.37	0.32	0.46	0.23

_____Sommerversuche_____

_____Winterversuche_____

Tabelle 13: Dissoziationskonstante, K_d für (-) 125 J-Cyp
bei Frauen [pmol/l]

Die Versuchspersonen 4, 5 und 6 wurden im Sommer (Juni bis Juli), die Versuchsperson 9 im Winter (Dezember) untersucht.

Die Ergebnisse sind in pmol/l angegeben.

Proband	4	5	6	9
Uhrzeit				
18	3.13	2.24	4.86	1.78
22	3.19	4.76	5.56	3.59
02	2.68	2.18	3.73	3.07
06	2.06	2.62	3.82	1.37
10	1.60	3.91	3.11	5.54
14	3.27	2.65	5.84	3.82
18	3.43	4.27	3.70	5.79
24h x	2.77	3.23	4.37	3.57
± SE	0.26	0.39	0.39	0.63
_____Sommerversuche_____			_____Winterversuch_____	

LEBENS LAUF

Ich, Andreas Markus Pangerl wurde am 18. Januar 1962 als einziges Kind von Ewald Pangerl, jetzt Ministerialrat am bayerischen Wirtschaftsministerium, und seiner Frau Ursula Pangerl, geb. Silberkuhl, in Hannover geboren.

Seit 1964 bin ich in München 40, Osterwaldstr.59, wohnhaft. Nach dem Abitur am Luitpoldgymnasium in München im Jahre 1981 begann ich zum Wintersemester 1981 das Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität in München. 1984 absolvierte ich eine dreiwöchige Famulatur in Tokio / Japan an der Tokio Yoshidai Medical School; Abteilung für plastische Chirurgie, 1985 eine vierwöchige Famulatur in Anaesthesie an der Harvard Medical School / Boston Massachusetts, USA. Im Praktischen Jahr war ich an der städtischen Klinik, Abteilung für Innere Medizin in Neuperlach/München, an der städtische Klinik, Abteilung für Chirurgie in Schwabing/München, und in der Universitätsnervenklinik der Ludwig-Maximilians Universität in der Nußbaumstraße/München, tätig. Meine Approbation als Arzt erhielt ich, nach bestandenem 3. Abschnitt des ärztlichen Staatsexamens am 12. November 1987.

Seit Januar 1985 bin ich Mitglied des chronobiologischen Arbeitskreises in München, seit April 1986 Mitglied der European Society for Chronobiology (ESC) und seit Juli 1986 Mitglied der International Society for Chronobiology (ISC).

